

Neugeborenen-Screening (NGS) in Thüringen, Verfahrensvergleich,
Folgediagnostik und Behandlung von angeborenen
Stoffwechselerkrankungen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Simone Gehlert
geboren am 11.08.1980 in Schmölln

Gutachter:

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| 3-HIVA | 3 - Hydroxyisovaleriansäure |
| 3-MCC | 3 - Methylcrotonylcarboxylase |
| 6-PGD | 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase |
| AC | Acylcarnitine |
| ACADM | acyl-Coenzyme-A-dehydrogenase, medium chain |
| AGS | Adrenogenitalessyndrom |
| AS | Aminosäuren |
| BB | Blutbild |
| BCAA | Branched-Chain Amino Acids |
| BCKDH | Branched-Chain-2-Keto-Acid-Dehydrogenase |
| BH2 | Dihydrobiopterin |
| BH4 | Tetrahydrobiopterin |
| BZ | Blutzucker |
| C0 | Freies Carnitin |
| C3 | Propionyl-Carnitin |
| C4 | Butyryl-Carnitin |
| C6 | Hexanoyl-Carnitin |
| C8 | Octanoyl-Carnitin |
| C10 | Decanoyl-Carnitin |
| CPT | Carnitin-Palmitoyl-Transferase |
| CPT I - Mangel | Carnitin-Palmitoyl-Transferase I |
| CPT II - Mangel | Carnitin-Palmitoyl-Transferase II |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DGNS | Deutsche Gesellschaft für Neugeborenenenscreening |
| EDTA | Ethlendiamintetraessigsäure |
| ERT | Enzyersatztherapie |
| FG | Frühgeburt |
| FP | Falsch Positive |
| FS | Fettsäuren |
| GA I | Glutaracidurie I |
| GA II | Glutaracidurie II |
| Gal-1-P | Galaktose-1-Phosphat |

| | |
|-----------|---|
| Gal-1-PUT | Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase |
| G-6-PD | Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| GALT | Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase |
| Hb | Hämoglobin |
| HPA | Hyperphenylalaninämie |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatographie |
| IVA | Isovalerianacidurie |
| LCHADD | Long-Chain-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Deficiency |
| MCADD | Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Deficiency |
| MCC | Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase |
| MMA | Methylmalonacidämie |
| MPS | Mucopolysaccharidose |
| MSUD | Maple Syrup Urine Disease, Ahornsirupkrankheit |
| NADP | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NADPH | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert) |
| NGS | Neugeborenencreening |
| PA | Phenylalanin |
| PKU | Phenylketonurie |
| PPA | Propionacidämie |
| PV | Positiver Vorhersagewert |
| RG | Reifgeborene |
| RR | Recallrate |
| SCAD | Short-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase |
| TLLV | Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit |
| TMS | Tandemmassenspektrometrie |
| UDP | Uridyldiphosphat |
| UDPG | Uridin-5'-Diphosphoglukose |
| UDP-GAL | Uridindiphosphogalaktose |
| VLCAD | Very-Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 2 |
| Inhaltsverzeichnis..... | 4 |
| | |
| 1. Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Screening auf Phenylketonurie (PKU)..... | 9 |
| 1.2 Screening auf Galaktosestoffwechselstörungen / Klassische Galaktosämie..... | 10 |
| 1.3 Screening auf Biotinidase-Mangel | 11 |
| 1.4 <i>Erweitertes Neugeborenen</i> screening mittels Tandemmassenspektrometrie (TMS)..... | 12 |
| 1.5 Zielerkrankungen der Tandemmassenspektrometrie..... | 13 |
| 1.5.1 Aminoazidopathien | 14 |
| 1.5.2 Störungen des Fettsäurestoffwechsels..... | 18 |
| 1.5.3 Organoazidopathien..... | 21 |
| 1.5.4 Harnstoffzyklusdefekte | 25 |
| 1.6 Ziele des Neugeborenen Screenings | 25 |
| | |
| 2. Zielstellung der Arbeit | 26 |
| | |
| 3. Material und Methoden | 27 |
| 3.1 Ablauf des Neugeborenen Screenings | 27 |
| 3.2 Labormethoden..... | 28 |
| 3.2.1 PKU..... | 28 |
| 3.2.2 Galaktosämie..... | 28 |
| 3.2.3 Biotinidase..... | 30 |
| 3.2.4 Tandemmassenspektrometrie (TMS) | 31 |
| 3.3 Analyse der Labordaten | 33 |
| 3.3.1 Erfassung der in Thüringen auffälligen Befunde | 33 |
| 3.4 Sensitivität, Spezifität und Positiver Vorhersagewert des Neugeborenen Screenings | 35 |
| 3.4.1 Fluorimetrische Methode zur Phenylalaninbestimmung..... | 35 |
| 3.4.2 Galaktosämie..... | 36 |
| 3.4.3 Biotinidasemangel..... | 36 |
| 3.4.4 Konventionelle Methoden und Tandemmassenspektrometrie (TMS) | 37 |
| 3.5 Statistische Analysen..... | 38 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.5.1 | Statistische Analysen bezüglich der PKU-Verdachtsfälle | 38 |
| 3.5.2 | Statistische Analysen zu den Galaktosämie-Erkrankungen | 39 |
| 3.5.3 | Analyse der MCAD-Mangel Patienten | 40 |
| 3.5.4 | Statistische Analyse zu den Tyrosinämieverdachtsfällen | 40 |
| 4. | Ergebnisse | 41 |
| 4.1 | Resultate der einzelnen Labormethoden | 42 |
| 4.2 | Veränderungen beim PKU-Screening | 46 |
| 4.2.1 | Vergleich zwischen Ergebnissen der Fluorometrie und der TMS | 46 |
| 4.2.2 | Vergleich der Screeningparameter, die auf eine PKU oder HPA hindeuten | 47 |
| 4.2.3 | Höhe der Erstscreeningswerte und resultierende Verdachtsdiagnose | 48 |
| 4.3 | Ergebnisse für Galaktosämie und Biotinidase | 51 |
| 4.3.1 | Galaktosämie | 51 |
| 4.3.2 | Gegenüberstellung von Gesamtgalaktose-Bestimmung und Gal-1-PUT-Messung | 52 |
| 4.3.3 | Biotinidase | 53 |
| 4.4 | Resultate seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie (TMS) | 54 |
| 4.4.1 | Ergebnisse von Erstscreening und Zweitscreening (Recall) in Zahlen | 55 |
| 4.4.2 | Aus den Ergebnissen resultierende Recallraten und Positive Vorhersagewerte ... | 60 |
| 4.4.3 | Bestätigte Fälle | 63 |
| 4.5 | Die Aminosäurestoffwechselstörungen | 64 |
| 4.6 | Ergebnisse für Störungen des Fettsäurestoffwechsels | 64 |
| 4.6.1 | Ergebnisse des Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangels (MCADD) | 64 |
| 4.6.2 | LCHAD-Mangel (LCHADD) und VLCAD-Mangel (VLCADD) | 66 |
| 4.7 | Störungen im Stoffwechsel organischer Säuren | 66 |
| 4.7.1 | 3-MCC-Mangel | 66 |
| 4.8 | Einfluss des Gestationsalters auf das Neugeborenencreening durch TMS | 67 |
| 5. | Diskussion | 72 |
| 5.1 | Bezugsdaten | 72 |
| 5.2 | Die Ansprüche an das Neugeborenencreening, die Screeningkriterien und ihre Bedeutung für die Tandemmassenspektrometrie | 73 |
| 5.2.1 | Die Häufigkeiten der Erkrankungen und ihre Bedeutung für das Neugeborenencreening | 73 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.2.2 | Krankheitswert der erfassbaren Erkrankungen | 75 |
| 5.2.3 | Therapiemöglichkeiten | 76 |
| 5.3 | Effizienz der eingesetzten Screeningverfahren | 77 |
| 5.3.1 | Fluorometrie oder Tandemmassenspektrometrie zum Screening auf PKU | 77 |
| 5.3.2 | Galaktosämiescreening | 79 |
| 5.3.3 | Biotinidascreening | 82 |
| 5.3.4 | Tandemmassenspektrometrie | 83 |
| 5.3.5 | Aminosäurestoffwechselstörungen | 83 |
| 5.3.6 | Störungen der β -Oxidation und des Carnitinstoffwechsels | 85 |
| 5.3.7 | Organoazidopathien | 87 |
| 5.3.8 | Harnstoffzyklusdefekte | 88 |
| 5.3.9 | Fälle von sekundärem Carnitinmangel | 89 |
| 5.4 | Differentialdiagnosen zur Sicherung des Befundes/ Konfirmationsdiagnostik | 90 |
| 5.5 | Der Einfluss des Gestationsalters auf das Screening durch TMS | 91 |
| 5.6 | Kosten-Nutzen-Verhältnis | 93 |
| 5.7 | Ethische Fragen und Probleme des Neugeborenen Screenings | 96 |
| 5.8 | Sensitivität und Spezifität der Verfahren | 98 |
| 6. | Schlussfolgerungen und Ausblick | 101 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 105 |
| 8. | Anhang | 115 |
| | Abbildungsverzeichnis | 119 |
| | Tabellenverzeichnis | 120 |
| | Lebenslauf | 121 |
| | Ehrenwörtliche Erklärung | 122 |
| | Danksagung | 123 |

Zusammenfassung

Das Neugeborenencreening auf angeborene Erkrankungen wie PKU, Galaktosämie oder Hypothyreose ist ein seit Jahrzehnten etabliertes und akzeptiertes Verfahren. Basierend auf dem fortgesetzten Bestreben, das Neugeborenencreening zu erweitern bzw. zu verbessern, wurde in den letzten Jahren zunehmend die Tandemmassenspektrometrie (TMS) eingesetzt. Durch diese neue Methode ist es möglich, unter Verwendung eines einzelnen Blutstropfens auf einer Trockenblutkarte auf alle zehn derzeit als Zielerkrankungen eingestuften Stoffwechselstörungen zu screenen.

In Thüringen wurde dieses Verfahren am 01.11.2001 eingeführt. Seitdem ist es möglich, mit einer Methode auf Störungen des Fettsäurestoffwechsels, des Aminosäurestoffwechsels und Organoazidopathien zu untersuchen. Bedingt durch die Einführung der TMS, ergaben sich Veränderungen für das PKU-Screening, das nun mit Hilfe der TMS erfolgt. Durch die Verwendung der TMS wurde die Vorverlegung des Screeningzeitpunktes auf den dritten Lebenstag notwendig, dies machte eine Umstellung des Galaktosämiescreenings notwendig. Am 11.09.2003 wurde anstelle der Messung der Gesamtgalaktose die Gal-1-PUT-Aktivitätsmessung eingeführt deren Ergebnisse unabhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme sind.

Die Ergebnisse und Befunde, die das Thüringer Neugeborenencreening seit 1997 erbrachte, wurden für diese Arbeit retrospektiv aufgearbeitet. Es wurden sowohl die Resultate vor als auch die Resultate nach der Methodenumstellung erfasst und in Hinsicht auf Veränderungen, die mit der Einführung der TMS in Zusammenhang stehen, verglichen.

Abgesehen von sechs PKU und drei HPA-Fällen erkannte das *Erweiterte Neugeborenencreening* durch TMS vier Fälle von MCAD-Mangel, einen Fall von LCHAD-Mangel, einen Fall von Propionazidämie, zwei Fälle von mildem 3-MCC-Mangel, vier milde Homocysteinurien und eine milde Methylmalonazidurie. Die Recallrate, die den Anteil an positiven Befunden des Neugeborenencreenings angibt, stieg bedingt durch die TMS von durchschnittlich 0,47% auf 1,17% an. Der positive Vorhersagewert des Neugeborenencreenings auf Stoffwechselerkrankungen fiel von 9,60% auf 7,65%. Ein Anstieg der Recallrate war bei Einführung einer neuen Methode und einer damit verbundenen massiven Erweiterung des Neugeborenencreenings zu erwarten. Mit zunehmender Anwendungsdauer und zunehmenden Erfahrungswerten, ist ein Rückgang der Recallrate wahrscheinlich. Der positive Vorhersagewert der TMS selbst lag in Thüringen bei rund 7% und damit in einem mittleren Bereich. Im bayerischen Modellprojekt wurden lediglich 5% erreicht (Liebl et al. 2001a), während dieser Wert in einer Studie von Schulze et al. (2003) 11,31% betrug.

Beim Screening auf PKU bzw. HPA stieg nach Einführung der TMS die Recallrate von 0,11% auf 0,12% an. Der positive Vorhersagewert verbesserte sich von 17% auf 24%. Es zeigte sich, dass PKU-Patienten schon im Erstscreening signifikant höhere Phenylalaninwerte bzw. eine signifikant höhere Phe/Tyr-Ratio aufweisen als HPA-Patienten oder falsch Positive. Eine alleinige Erhöhung der Phe/Tyr-Ratio stellt laut den vorhandenen Daten keinen ausreichenden Hinweis auf das Vorliegen einer Erkrankung des Phenylalaninstoffwechsels dar.

Das Screening auf Galaktosämie mittels Gal-1-PUT-Messung führte, verglichen mit der Bestimmung der Gesamtgalaktose im Blut, zu einer Verdopplung der Recallrate von 0,15% auf 0,30% und einer Verbesserung des positiven Vorhersagewertes von 11% auf 15%. Es wurde gezeigt, dass zwischen der Gal-1-PUT-Aktivität und der Menge an Gesamtgalaktose im Blut ein negativ korrelierter, signifikanter Zusammenhang besteht.

Weiterhin wurde der Einfluss des Gestationsalters auf das Neugeborenencreening betrachtet. Es zeigte sich, dass der Anteil an Frühgeborenen unter den im Neugeborenencreening auffälligen Kindern, erheblich höher als in der Normalbevölkerung ist. Unter den einzelnen erfassten Erkrankungen variierte der Anteil stark. Nur 4,76% der für Citrullin Auffälligen waren Frühgeborene, während der Anteil bei den für Tyrosin Auffälligen bei 60,87% lag.

Soweit es das Verhältnis von Kosten zu Nutzen betrifft, sollte es nach vorliegenden Kenntnissen und Daten Ziel sein, die entsprechenden Erkrankungen so früh wie möglich zu erkennen und durch frühzeitige Therapieeinleitung sowohl Lebenserwartung als auch Lebensqualität zu verbessern. Die pro Lebensjahr anfallenden Behandlungskosten können so möglichst niedrig gehalten werden.

Das *Erweiterte Neugeborenencreening* mittels TMS stellt einen entscheidenden Schritt bei der frühzeitigen Diagnostik mehrerer angeborener Stoffwechselerkrankungen dar. Weiteren Untersuchungen bleibt die Frage vorbehalten, inwieweit das Spektrum der durch das Neugeborenencreening erfassten Erkrankungen in Zukunft erweitert werden kann und sollte.

1. Einleitung

Der Zweck des Neugeborenencreenings ist es, Individuen mit behandelbaren, angeborenen Stoffwechselerkrankungen bereits im Neugeborenenalter zu identifizieren, um rechtzeitig, möglichst präsymptomatisch, eine Behandlung einleiten zu können. Sinn macht ein solches Verfahren vor allem dann, wenn man dadurch die entsprechenden Erkrankungen in einem Alter erkennt, indem eine medizinische Intervention klinische Symptome verhindern oder reduzieren kann.

Das Neugeborenencreening, das Filterpapiertestkarten mit Blutstropfen benutzt, hat seinen Ursprung in den frühen 60ern des zwanzigsten Jahrhunderts (Koch 1997; Loeber et al. 1999). Damals wurde zunächst der sogenannte Guthrietest (mikrobiologischer Hemmtest) zur Erkennung von erhöhtem Phenylalanin und damit zur Diagnosestellung bei Phenylketonurie (PKU) bzw. Hyperphenylalaninämie benutzt. In Deutschland wurde das Neugeborenencreening Ende der 60er Jahre (1969 BRD, 1971 DDR) als staatlich finanzierte Untersuchung (Liebl et al. 2001) flächenübergreifend eingeführt. Neuere Testverfahren, die nach und nach entwickelt wurden, nutzen dieselben Filterpapiertestkarten, wie sie beim Guthrietest verwendet werden.

In Thüringen wurde im November 2001 das aktuell modernste Screeningverfahren, die Tandemmassenspektrometrie, eingeführt (Seidel et al. 2002). Seit 1997 bis zur Einführung der Tandemmassenspektrometrie screenete man, unter Verwendung verschiedener Labormethoden, auf drei verschiedene angeborene Stoffwechselerkrankungen (PKU, Galaktosämie und Biotinidasemangel). Das Screening mittels Tandemmassenspektrometrie, das derzeit neben der PKU zusätzlich neun Stoffwechselerkrankungen beinhaltet, wird als *Erweitertes Neugeborenencreening* bezeichnet.

1.1 Screening auf Phenylketonurie (PKU)

Die PKU ist mit einer Häufigkeit von 1:8.500 (Seidel et al. 2002) in Thüringen die verbreitetste und am besten behandelbare, angeborene Stoffwechselstörung. Sie wird in der Häufigkeit nur von der angeborenen Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) mit 1:4.000 (Roscher et al. 2001, Liebl et al. 2002) überboten.

Verursacht wird die PKU durch eine funktionelle Störung des Enzyms Phenylalanin-Hydroxylase, das den Abbau von Phenylalanin zu Tyrosin katalysiert. Es kommt dabei zu einem Anstieg des Phenylalanins im Blut, der durch das Neugeborenencreening nachgewiesen wird. Unbehandelt führt die PKU zu einer schweren geistigen Entwicklungsstörung, teilweise kombiniert mit ausbleibender Sprachentwicklung und

Verhaltensstörungen (Liebl et al 2002). Eine frühe Detektion dieser Erkrankung bereits im Neugeborenenalter erlaubt die Einleitung einer diätetischen Therapie. Die strenge phenylalaninarme Ernährung muss bereits innerhalb der ersten beiden Lebenswochen begonnen werden. Seit Einführung der Frühdiagnostik und der damit verbundenen Vorverlegung des Therapiebeginns kann eine normale körperliche und geistige Entwicklung der PKU-Patienten erreicht werden.

Die Einführung der Tandemmassenspektrometrie zum Screening auf PKU im November 2001 sollte vor allem im Vergleich zur bis dahin verwendeten Fluorometrie (enzymatischer Test) eine höhere Selektivität und Sensitivität erreichen (Roscher et al. 2001). Außer der klassischen PKU werden durch dieses Screening auch milde Varianten der PKU auffällig, die aber meist nicht behandlungsbedürftig sind. Eine spezielle Variante mit besserer Prognose spricht auf die Gabe von BH₄, einem Cofaktor der Phenylalanin-Hydroxylase, an (Liebl et al 2002), diese wird aber durch den teilweise damit verbundenen zentralen Neurotransmittermangels eingeschränkt.

1.2 Screening auf Galaktosestoffwechselstörungen / Klassische Galaktosämie

Die *Klassische Galaktosämie* mit einer Häufigkeit von 1:45.000 (Podskarbi und Bieger 1995) gehört zu der Gruppe der Stoffwechselstörungen, die durch konventionelle Screeningverfahren erfasst werden.

Galaktoseerhöhungen im Blut und in anderen Kompartimenten können durch die Defizienz drei verschiedener Enzyme hervorgerufen werden. Die häufigste und bedeutendste Störung ist der Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase-Mangel (Gal-1-PUT-Mangel), der bei homozygoten oder bestimmten *compound* heterozygoten Mutationen im Gal-1-PUT-Gen die schwere klassische Galaktosämie verursacht. Außerdem können der Galaktokinase- und der UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel zu erhöhten Galaktose-Blutwerten führen (Podskarbi und Bieger 1995). Diesen beiden Störungen wird weniger Krankheitswert beigemessen, sie kann jedoch ursächlich an der Pathogenese des Juvenilen Katarakts oder unspezifischer Leberfunktionsstörungen beteiligt sein (Liebl et al. 2002).

Der Gal-1-PUT-Mangel ist dadurch charakterisiert, dass sich unter Zufuhr galaktosehaltiger Nahrung eine schwere lebensbedrohliche Leberfunktionsstörung entwickelt. Zusätzlich können bei Behandlungsverzögerung eine irreversible beidseitige Augenlinsentrübung (Katarakt) und eine psychomotorische Retardierung auftreten (Seidel et al. 2002). Eine frühzeitige Diagnose und rechtzeitige Einleitung einer galaktosearmen diätetischen Therapie verhindert den Krankheitsausbruch und mögliche Frühkomplikationen. Bei der klassischen Galaktosämie ist eine lebenslange, strenge, galaktosearme Diät erforderlich, die sich jenseits

des Säuglingsalters wegen des „versteckten“ Gehaltes an Galaktose (Laktose) in verschiedenen Nahrungsmitteln oft schwierig gestaltet. Bei partiellen Enzymmangelzuständen ist teilweise eine Reduktion der Galaktosebelastung über Zwiemilchernährung (Muttermilch oder Säuglingsmilch auf Kuhmilchbasis / galaktosefreie Nahrung) ausreichend. Als Kriterium dafür dient sowohl die Gal-1-PUT-Restaktivität als auch die Konzentration an Gal-1-Phosphat. Bis 2003 screenete man auf die Konzentration der Substrate, d.h. auf Galaktose und Galaktose-1-Phosphat. Erst bei auffälliger Erhöhung untersuchte man semiquantitativ enzymatisch auf die Gal-1-PUT-Aktivität mit Hilfe des Beutler-Tests. Dieses methodische Vorgehen hatte den Nachteil, dass der im Blut bestimmte Galaktosespiegel von der Nahrungszufuhr abhängig war und erst bei ausreichender Galaktosezufuhr über Muttermilch oder Säuglingsnahrung am fünften Lebenstag eine ausreichende Sensitivität vorlag. Im Falle positiver Erhöhungen von Galaktose und Galaktose-1-Phosphat konnten mit diesem Test ursächlich neben dem Gal-1-PUT-Mangel auch weitere Enzymdefekte des Galaktosestoffwechsels erfasst werden, deren klinische Bedeutung und Therapieindikation wie bereits beschrieben teilweise unklar ist.

Im September 2003 entschloss man sich in Thüringen, entsprechend der damals gültigen Screeningrichtlinien, zur Umstellung des Screeningverfahrens. Die ab 11.09.2003 angewandte Messung der Gal-1-PUT-Aktivität berücksichtigte nur noch die klassische Galaktosämie, für die eine klinische Relevanz nachgewiesen ist. Die Messung der Gal-1-PUT-Aktivität ist von der Galaktosezufuhr mit der Nahrung unabhängig (Liebl et al. 2001a). Die alte, substratabhängige Screeningmethode für Galaktosämie lieferte am dritten Lebenstag noch keine zuverlässigen Resultate.

Seit dem 01.04.2005 wird die Nutzung beider Screeningverfahren durch die Screeningrichtlinien (Deutsches Ärzteblatt 2005) empfohlen. Seitdem werden beide Screeningverfahren angewandt und das Galaktosämiescreening für Thüringen findet, wie alle anderen klassischen Screeningverfahren, im Neugeborenenscreeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig statt.

1.3 Screening auf Biotinidase-Mangel

Der Biotinidasemangel wird durch ein konventionelles Screeningverfahren erfasst. Die Untersuchung dieser Erkrankung erfolgt parallel zum Screening auf PKU und Galaktosämie und seit 2001 auch parallel zur Tandemmassenspektrometrie. Der komplette Biotinidase-Mangel ist in der deutschen Bevölkerung mit 1:60.000-1:150.000 (Zabransky 2001) eher selten. Er wird klinisch durch psychomotorische Retardierung, Hautekzeme und Haarausfall auffällig (Liebl et al. 2002) und wird durch Biotin (Vitamin H) -Substitution frühzeitig, gut und nebenwirkungsfrei behandelt. Partielle Biotinidasemangelzustände sind häufiger und

werden ebenfalls im Neugeborenencreening erfasst. Ein Teil der Patienten mit partiellen Mangelzuständen wird aus Sicherheitsgründen zur Vermeidung klinischer Symptome, zumindest im Neugeborenen- und Säuglingsalter, mit Biotin behandelt.

Die Untersuchung der Biotinidaseaktivität ist seit mehr als zehn Jahren etabliert und erfolgt, indem der Biotinidase des Blutstanzlings ein Substrat angeboten wird. Die bei dieser Reaktion entstehenden Produkte werden mit Hilfe einer photometrischen Methode gemessen.

1.4 Erweitertes Neugeborenencreening mittels Tandemmassenspektrometrie (TMS)

Im November 2001 wurde in Thüringen die Tandemmassenspektrometrie eingeführt. Diese Methode ermöglicht es, Störungen verschiedener Stoffwechselwege zu erfassen. Die Metabolitenmuster der Aminosäuren und der Acylcarnitine erlauben die Diagnostik von Aminosäurenstoffwechselstörungen, Fettsäureoxidaionsdefekten, Organoazidopathien und Harnstoffzyklusstörungen (Schulze et al. 2003).

Das Prinzip der Massenspektrometrie besteht darin, dass geladene Teilchen, die im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden, sich anschließend durch ein Magnetfeld unterschiedlich stark ablenken lassen. Diese Ablenkung ist proportional zum Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). Unabdingbar sind ein hoher Probendurchsatz, möglichst geringer Probenverbrauch und eine einfache Probenvorbereitung ohne aufwendige Reinigungs- und Trennverfahren. Erst durch die Einführung der Elektrospray-Ionisation wurde die Methode dem Massenscreening zugänglich (Roscher et al. 2001).

Das Neugeborenencreening kann seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie potentiell mehr als 30 (Chace et al. 2003; Wilcken et al. 2003) angeborene Stoffwechselerkrankungen erfassen. Tabelle 1 zeigt im Einzelnen die Erkrankungen, die während des Erhebungszeitraums für das Neugeborenencreening empfohlen wurden und laut der aktuellen Screeningrichtlinien (Anhang A2) erfasst werden müssen. Diese Zielerkrankungen entstammen den Richtlinien, die die ständige Kommission für Neugeborenencreening, der Arbeitsgemeinschaften für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) und für Pädiatrische Endokrinologie (APE), der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und der Deutschen Gesellschaft für Neugeborenencreening (DGNS), in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) und der Deutschen Gesellschaft für Perinatale Medizin (DGPM) 2002 erarbeitet hat. Die vorliegende Arbeit beinhaltet aber das volle Spektrum der durch Tandemmassenspektrometrie detektierten Krankheiten in dem Zeitraum vom 01.11.2001 bis zum 31.12.2003. Eine Übersicht über mehr als 30 potentiell

erfassbare Erkrankungen zeigt die Tabelle in Anhang A1. Seit dem 01.04.2005 erfasst das Neugeborenencreening Labor des Universitätsklinikums Leipzig nur noch die Stoffwechselerkrankungen, die laut der aktuellen Screeningrichtlinien untersucht werden müssen (Anhang A2), alle weiteren Daten werden vernichtet. Die positiven Ergebnisse werden an den Einsender sowie das Thüringer Behandlungszentrum weitergegeben.

Tabelle 1: Für das Neugeborenencreening empfohlene Zielkrankheiten

Konventionelle Testverfahren

- Hypothyreose
 - Androgenitales Syndrom (AGS)
 - Biotinidasemangel
 - Klassische Galaktosämie
-

Tandemmassenspektrometrie

Aminoazidopathien

- Phenylketonurie (PKU) und Hyperphenylalaninämie (HPA)
- Ahornsiruperkrankung

Fettsäureoxidations-Defekte

- Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase(MCAD)-Mangel
- Long-Chain-3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase(LCHAD)-Mangel
- Very-Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-(VLCAD)-Mangel

Carnitinzyklus-Defekte

- Carnitin-Palmitoyl-Transferase(CPT)-I-Mangel
- Carnitin-Palmitoyl-Transferase(CPT)-II-Mangel
- Carnitin-Acylcarnitin-Translokase-Mangel

Organoazidurien

- Glutarazidurie Typ I (GAI)
 - Isovalerialazidämie (IVA)
-

Die Tabelle entstammt den Screeningrichtlinien von 2002 und wurde leicht modifiziert. Dargestellt sind die Erkrankungen, die laut den Screeningrichtlinien als Zielkrankheiten des Neugeborenencreenings gelten.

1.5 Zielerkrankungen der Tandemmassenspektrometrie

Die Zielerkrankungen und weitere häufige bzw. potentiell bedeutsame Erkrankungen für das Neugeborenencreening werden im Folgenden beschrieben. Über viele dieser zum Teil sehr seltenen Krankheiten gilt es Daten zu sammeln, um besser über die Epidemiologie in einzelnen Regionen und Bevölkerungsgruppen, die Diagnostizierbarkeit, die Therapierbarkeit sowie die langfristigen Prognosen informiert zu sein. Anhand dieser Angaben wird das Neugeborenencreening hinsichtlich Sensitivität und Spezifität optimiert und Erkrankungen in den Kreis der Zielerkrankungen aufgenommen.

Ein wichtiges Problem des Neugeborenencreenings ist der Einfluss des Gestationsalters auf die Ergebnisse. Frühgeborene sind besonders anfällig für transitorische Stoffwechselveränderungen, die zu erhöhten Werten und damit zu falsch positiven Resultaten führen.

1.5.1 Aminoazidopathien

a) Die Ahornsirupkrankheit (MSUD)

Dieser Erkrankung liegen verschiedene genetische Defekte im Multienzymkomplex der verzweigtkettigen 2-Ketosäuren-Dehydrogenase (*branched-chain-2-keto-acid-dehydrogenase*, *BCKDH*) zugrunde. Dieser in den Mitochondrien lokalisierte Enzymkomplex besteht aus den Untereinheiten E1 α , E1 β , E2 und E3. Da er, wie in Abbildung 1 dargestellt, für den Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin verantwortlich ist, kommt es bei einer Beeinträchtigung der BCKDH zu einem Stoffwechselblock und einer Erhöhung der zuvor genannten Aminosäuren, sowie der aus ihnen resultierenden Ketosäuren in Blut und Gewebe. Namen gebendes Merkmal der Erkrankung ist ein ahornsirupartiger Geruch von Urin und Körperflüssigkeiten unbehandelter Patienten (Lentze et al. 2003, Morgenthaler 2004).

Abbildung 1: Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren

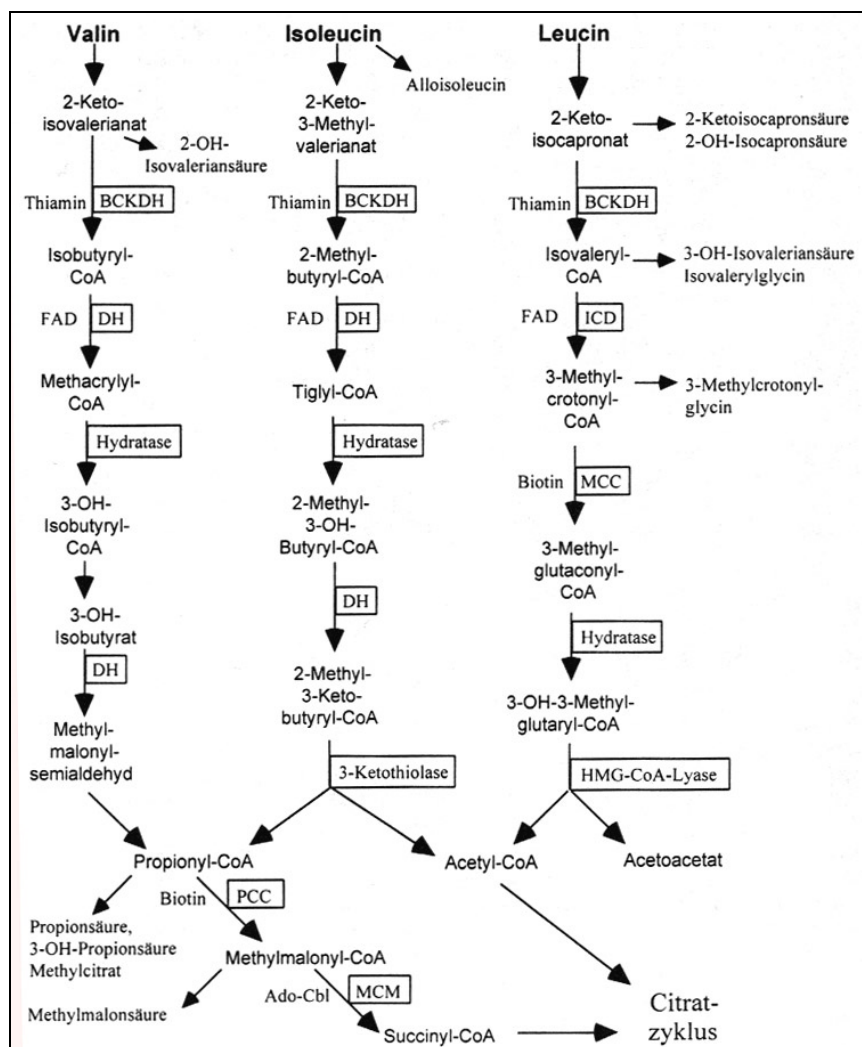


Abbildung aus Zschocke und Hoffmann (2002). Dargestellt ist der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin.

Die Häufigkeit dieser Erkrankung wird mit ca. 1:50.000 angegeben (Liebl et al. 2002). Die MSUD existiert in unterschiedlichen Schweregraden. Bei der klassischen Form (meist durch die Missensmutation Y393N verursacht) fehlt die Enzymaktivität quasi vollständig, während bei den leichteren Formen (intermediäre und intermittierende Form) die Enzymrestaktivität zwischen 2 und 25% liegen kann.

Die klassische MSUD wird typischerweise bereits in der Neugeborenenperiode (Walter 2001) zwischen dem vierten und siebten Lebenstag auffällig. Nach Beginn der Nahrungsaufnahme (Säuglingsmilch, Muttermilch) steigen infolge der Enzymstörung Leucin und die zugehörige 2-Ketoisocaproinsäure an. Wird eine kritische Schwelle überschritten, kommt es zu Somnolenz und Trinkschwäche, gefolgt von Gewichtsverlust und fortschreitenden neurologischen Symptomen, bis hin zu einer schweren Enzephalopathie. Solche Zustände können unbehandelt bis hin zu einer respiratorischen Insuffizienz und bis zu Koma oder sogar Tod fortschreiten (Chuang und Shih, 2001; Hoffmann und Mayatepek, 2001). Wird die Ursache früh genug erkannt und gelingt es, die Metaboliten zu senken, sind die Symptome reversibel.

Bei der intermediären oder intermittierenden Form sind messbare Restaktivitäten der BCKDH vorhanden (Walter 2001). Dennoch können sich bei der intermediären Form Entwicklungsverzögerungen und Krampfanfälle einstellen. Bei der intermittierenden Form ist typischerweise weder Wachstum noch Intelligenz beeinträchtigt, dennoch sind in Stresssituationen potentiell letale metabolische Dekompensationen möglich (Liebl et al 2002). Das Erweiterte Neugeborenencreening durch Tandemmassenspektrometrie erkennt die MSUD über erhöhte Leucin- und Isoleucin-Konzentrationen (Yoshino et al., 1986).

Die weitere Diagnostik umfasst die Analyse der Aminosäuren im Plasma mittels HPLC, wobei der Nachweis von Allo-Isoleucin pathognomisch für die MSUD ist. Zusätzlich sollten die organischen Säuren im Urin bestimmt werden (Morgenthaler 2004). Die Therapie erfordert eine lebenslange proteinarme Diät und die Substitution eines leucin-, valin-, und isoleucinfreien Gemischs von essentiellen Aminosäuren (Lentze et al. 2003). Die Prognose hängt von der biologischen Restaktivität, dem Zeitpunkt des Therapiebeginns und der langfristigen Einstellung des Stoffwechsels ab. Bei konsequenter Diät ist eine nahezu normale geistige Entwicklung möglich (Liebl et al. 2002).

b) Tyrosinämie Typ I, II, III

Tyrosin ist eine Aminosäure, die dem Körper, neben der Aufnahme von Nahrungseiweißen, auch durch die Aufspaltung von Gewebeeiweiß und, wie in Abbildung 2 dargestellt, durch die Hydroxylierung von Phenylalanin zugeführt wird (Liebl et al. 2002).

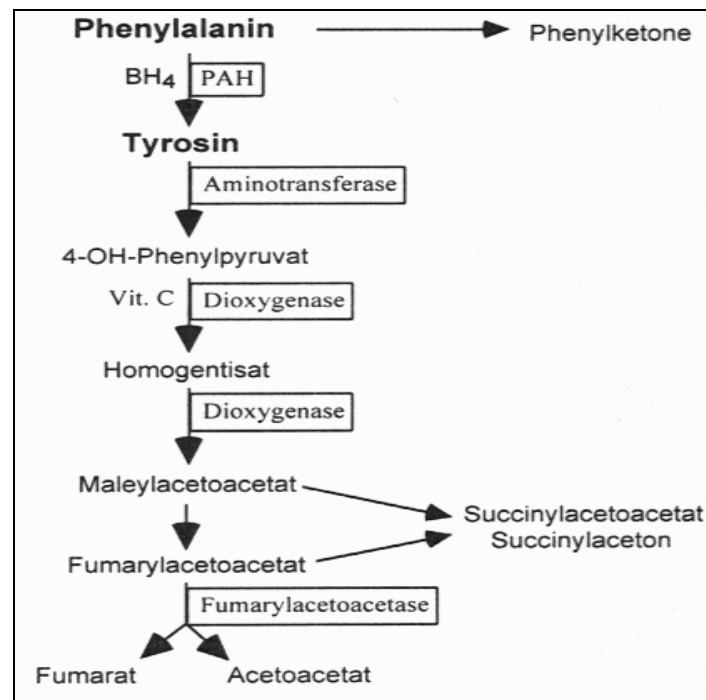
Die Hypertyrosinämie tritt in verschieden starken Intensitäten auf, von denen die Hypertyrosinämie Typ I (oder hepatorenale Hypertyrosinämie, HT I) die stärksten klinischen bzw. pathologischen Manifestationen, vor allem in Bezug auf die Leber, die Nieren und die peripheren Nerven, zeigt (Russo et al. 2001). Verursacht wird diese Störung durch einen Defekt der Fumarylacetoacetase, einem der letzten Enzyme in der Abbaukette des Tyrosins. Der resultierende Enzymblock führt zu einem Anstau verschiedener Stoffe. Leitparameter im Neugeborenen Screening ist Tyrosin (Liebl et al. 2002).

Die Tyrosinämie Typ II beruht auf einem Defekt der Aminotransferase (TAT), dem ersten Enzym beim Abbau des Tyrosins, das im Neugeborenen Screening durch erhöhte Tyrosinwerte auffällt (Liebl et al. 2002). Haut, Augen und ZNS-Beteiligung sind Kardinalsymptome der Erkrankung (Morgenthaler 2004).

Die Tyrosinämie Typ III beruht auf einer Störung im Bereich der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (4-HPPD), dem zweiten Enzym in der Abbaukaskade des Tyrosins, die als Cofaktor Ascorbinsäure benötigt. Die angeborene Form des Mangels (OMIM 276710) ist sehr selten und führt zu erhöhten Plasma-Tyrosin-Spiegeln und zu einer vermehrten Ausscheidung von Tyrosin-Metaboliten. (Ellaway et al. 2001; Mitchell et al. 2001).

Problematisch ist die Reifungsstörung des Enzyms 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, da sie die Spezifität des Neugeborenen Screenings auf Tyrosinämie beeinflusst. Diese Störung kann in Abhängigkeit von der Eiweißzufuhr bei 0,2 – 10% aller Neugeborenen festgestellt werden (Liebl et al. 2002). Kinder mit einer neonatalen transienten Tyrosinämie (OMIM 276500) können lethargisch und trinkschwach sein, ohne dass eine Leberschädigung feststellbar ist. Das Auftreten einer leichten geistigen Retardierung wird kontrovers diskutiert (Liebl et al.; 2002). Auch die transiente Form wird mitunter als Tyrosinämie Typ III bezeichnet. Sie wird durch Verringerung der Eiweißzufuhr und Vitamin C-Substitution behandelt.

Abbildung 2: Phenylalanin und Tyrosinabbau



Das Schema aus Zschocke und Hoffmann (2002) stellt den Abbau der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin dar.

c) Homocysteinurie und Hypermethioninämie

Leitparameter beim Screening auf Hypermethioninämie und Homocysteinurie ist die Methioninkonzentration im Blut. Verursacht wird die Homocysteinurie durch einen Mangel des Enzyms Cystathionin- β -Synthase. Es kommt zu einem unzureichenden Abbau von Homocystein zu Cystathion und über eine Homocysteinerhöhung zu einer Akkumulation von Methionin. Die hohe Homocysteinkonzentration verursacht Schäden der Blutgefäße (Sainani 2002), früh einsetzender Arteriosklerose mit Thrombosen und Embolien (Liebl et al. 2002). Außerdem gilt Hyperhomocysteinurie als Risikofaktor für Schlaganfälle (Parnetti et al. 2004). Homocystein kann eine abnorme Kollagenvernetzung induzieren, wodurch es zu Symptomen im Bereich des Bewegungsapparates und des Skelettes kommt. Durch die Aktivierung von Wachstumsfaktoren (Somatomedine) führt die Homocysteinurie zu Großwuchs (Liebl et al. 2002). Die Therapie erfolgt bei Patienten mit Enzymrestaktivitäten mittels Vitamin-B6-Gaben, bei allen anderen muss eine protein- und vor allem methioninarne Diät eingehalten werden. Eine Homocysteinurie entwickelt sich ebenfalls, wenn die Remethylierung von Homocystein zu Methionin blockiert wird (Liebl et al. 2002).

Die isolierte Hypermethioninämie entsteht durch verringerten Abbau von Methionin oder einen Mangel des Enzyms Methionin-Adenosyltransferase. Die geistige Entwicklung der Patienten kann normal oder eingeschränkt sein (Mudd et al. 1995, Morgenthaler 2004).

d) Phenylketonurie (PKU) / Hyperphenylalaninämie (HPA)

Die wichtigsten Fakten zur PKU und HPA wurden bereits im Kapitel 1.1 erläutert. Die Tandemmassenspektrometrie ermöglicht eine noch effizientere und frühere Detektion der Erkrankung. Die Unterscheidung zwischen klassischer PKU und milden Varianten soll durch die Einbeziehung zusätzlicher, in der Tandemmassenspektrometrie ermittelter Parameter verfeinert werden. Auf Grund ihrer Häufigkeit und des bekannten Krankheitswertes ist sie von entscheidender Bedeutung für die Effizienz der Tandemmassenspektrometrie (Roscher et al. 2001).

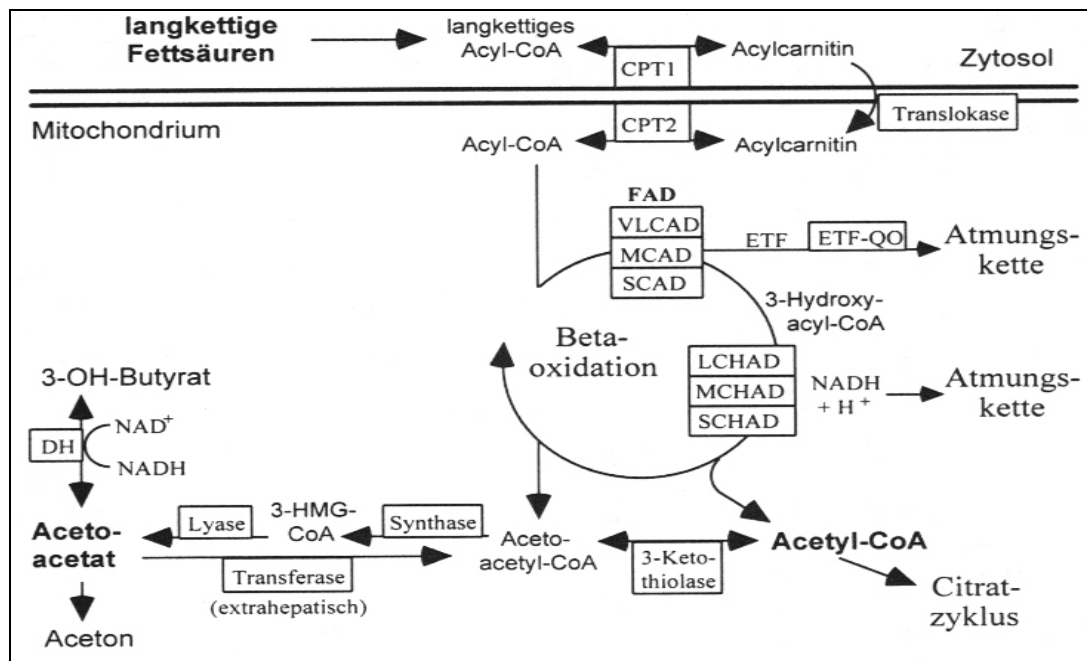
1.5.2 Störungen des Fettsäurestoffwechsels

a) Störungen der β -Oxidation

Die β -Oxidation ist ein Prozess in den Mitochondrien, bei dem die Kohlenstoffketten der Fettsäuremoleküle unter Abspaltung von Acetyl-CoA abgebaut werden. Das entstehende Acetyl-CoA wird in den Citratcyclus eingeschleust und dient der Energiegewinnung. Daher ist es logisch, dass es bei einer Störung dieses Prozesses, insbesondere in Situationen, in denen ein starker Stoffwechsel erforderlich ist, zu Beeinträchtigungen kommt. Jeder Zyklus der β -Oxidation (Abspaltung eines Moleküls Acetyl-CoA) wird unter Beteiligung einer längenspezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenase (VLCAD, MCAD oder SCAD) und einer längenspezifischen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (LCHAD, SCHAD) katalysiert (Liebl et al. 2002). Der Ablauf der β -Oxidation ist in Abbildung 3 dargestellt.

Störungen in diesem Bereich sind gekennzeichnet durch eine geringe Fastentoleranz, basierend auf der Unfähigkeit Fettsäuren als Reserveenergiequellen zu nutzen. Dadurch kommt es zum Anstau toxischer Stoffwechselzwischenprodukte.

Abbildung 3: Abbau von Fettsäuren



Das Schema aus Zschocke und Hoffmann (2002) verdeutlicht den Abbau der Fettsäuren im Mitochondrium. Es wird sowohl die β -Oxidation als auch der Carnitinzyklus dargestellt.

Die Bedeutendste Erkrankung in dieser Gruppe ist aufgrund ihrer Häufigkeit (1:10.000) der MCAD-Mangel (Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel), (Tanaka et al. 1997; Liebl et al. 2001a), bei dem eine Störung im Bereich der Dehydrogenasen vorliegt, die Fettsäuren mittlerer Kettenlänge umsetzen. Dies äußert sich unter anderem in Hypoglycämie, zunehmender Eintrübung, muskulärer Hypotonie, Krämpfen und Bewusstlosigkeit bis hin zu Koma oder Tod. (Liebl et al. 2002). Die Erkrankung weist eine frühkindliche Mortalität von ca. 30% im Rahmen unerkannter metabolischer Entgleisungen bei katabolen Situationen (Infektionen, Operationen) auf. Bei 40% der Patienten verbleiben nach unerkannten Stoffwechselkrisen neurologische Schäden. Bei früher Diagnosestellung können diese Folgen durch eingehende Beratung (Vermeidung kataboler Situationen) und einfache Vorsorge (z.B. Carnitinsupplementierung) verhindert werden (Roscher et al. 2001). Leitparameter im Neugeborenenenscreening auf MCAD-Mangel ist C8 (Octanoyl-Carnitin). Die Bestätigungsdiagnostik erfolgt durch die Bestimmung der organischen Säuren im Urin (u.a. Dicarbonsäure, Suberylglycin) sowie durch wiederholte Untersuchung von freiem Carnitin (C0) und Acylcarnitinen im Plasma. Auch Blutzucker, Ketonkörper und der Säure-Basen-Haushalt werden überprüft. Einen endgültigen Nachweis und eine Klassifikation ermöglichen Mutationsanalysen.

Des Weiteren existieren Abbaustörungen im Bereich der langkettigen Fettsäuren. Zuständig für diese sind insbesondere die VLCAD (Very-Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase) und

die LCHAD (Long-Chain-3-Hydroxyacyldehydrogenase). Bei Defekten dieser Enzyme kommt es zu Kardiomyopathien oder Hepathopathien. Typisch sind Fälle von Hypoglycämie oder Skelettmuskelschwäche. In den schwersten Fällen werden Koma und plötzlicher Tod beobachtet. Von beiden Erkrankungen existieren mildere, dem MCAD-Mangel ähnliche Formen. Erkannt werden diese Störungen im Neugeborenen Screening durch Erhöhungen der langkettigen Fettsäuren im Trockenblut. Beim VLCAD-Mangel dienen speziell Tetradecenoyl-Carnitin (C14:1) und Tetradecadienoyl-Carnitin (C14:2) als Leitparameter. Für den LCHAD-Mangel erfüllen Hydroxy-Hexadecanoyl-Carnitin (C16-OH) und Hydroxy-Oleoyl-Carnitin (C18:1-OH) diese Aufgabe (Liebl et al. 2002). Die Behandlung erfolgt durch fettarme und kohlenhydratreiche Ernährung. Defekte dieser Gruppe zählen zu den Ursachen des plötzlichen unerwarteten Todes im Kleinkindesalter (Roscher et al. 2001).

Abschließend muss man den SCAD-Mangel (Short-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel) erwähnen, bei dem es zu hypoketotischen Hypoglycämien, metabolischer Azidose, muskulärer Hypotonie und Entwicklungsverzögerungen kommen kann (Liebl et al. 2001a, Seidel et al. 2003). Ein routinemäßiges Screening auf diese Erkrankung wird zum jetzigen Zeitpunkt nicht empfohlen. In vorausgegangenen Studien zum Neugeborenen Screening wurden für die SCAD keine befriedigenden Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erzielt. Hinsichtlich Konfirmationsdiagnostik und Nachsorge existieren noch zu viele Unsicherheitsfaktoren (Liebl et al. 2001a).

b) Carnitinzyklus-Defekte

Diese Störungen gehören zur großen Gruppe der Fettsäurestoffwechseldefekte. Gestört ist der Transport der langkettigen Fettsäuren zwischen Mitochondrien und Zellplasma (Abbildung 3). Der CPT I und CPT II-Mangel, sowie der Carnitin-Translokase-Mangel gehören zu den im Neugeborenen Screening empfohlenen Zielerkrankungen. Die Informationen zu diesen Erkrankungen entstammen dem Screeninghandbuch von Liebl et al. (2002).

Defekte der CPT führen zu Störungen des Carnitin/Acylcarnitin-Transportsystems. Dabei ist der CPT-I-Mangel durch eine ausgeprägte Hepatopathie gekennzeichnet. Bereits während der Neugeborenenperiode bzw. während der ersten beiden Lebensjahre kann es zu hypoglykämischen (hypoketotischen) Koma kommen. Unbehandelt ist diese Erkrankung mit einer hohen Rate neurologischer Defizite und einer hohen Mortalität assoziiert. Gekennzeichnet ist der CPT-I-Mangel durch erhöhtes freies Carnitin und erniedrigte Acylcarnitine (z.B. Palmitoyl-Carnitin).

Beim CPT-II-Mangel kann zwischen einer milden Form, die sich im frühen Erwachsenenalter äußert und durch belastungsinduzierte Rhabdomyolysen gekennzeichnet ist, und einer schwereren neonatalen Form unterschieden werden. Bei der neonatalen Form kommt es zu Episoden von lebensbedrohlichem Koma, Kardiomyopathie und Skelettmuskelschwäche. Auffällig wird die Störung durch erniedrigtes freies Carnitin und erhöhte langkettige Acylcarnitine.

Die Carnitin-Translokase ist ein Enzym, das den Übertritt von Fettsäuren der zytosolischen Seite der mitochondrialen Innenmembran in die Matrix der Mitochondrien bewirkt. Unbehandelt manifestiert sich der Carnitin-Translokase-Mangel im Neugeborenenalter. Typisch sind hypoketotische Hypoglycämien bei Fasten, Koma, Muskelschwäche und eine Kardiomyopathie. Diagnostiziert wird der Carnitin-Translokase-Mangel durch erniedrigtes Gesamtcarnitin, erhöhte langkettige Acylcarnitine und Dicarbonsäureverbindungen.

1.5.3 Organoazidopathien

a) IVA / Isovalerianazidämie und 3-MCC-Mangel

Diese Erkrankungen stellen Abbaustörungen der Aminosäure Leucin dar. Die Häufigkeit der IVA wird im Allgemeinen mit etwa 1:100.000 angegeben, der 3-MCC-Mangel gilt nach neuesten Erkenntnissen als die häufigste Organoazidopathie mit einer Inzidenz von ca. 1:40.000 (Liebl et al. 2002).

Zunächst soll der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel besprochen werden. Durch einen Defekt dieses Enzyms kommt es zu einem Anstau der stark neurotoxischen Isovaleriansäure und weiterer Abbauprodukte (Liebl et al. 2002). Die Krankheit tritt in zwei Schweregraden auf, einer akuten und einer chronisch intermittierenden Form (Feinstein und O'Brien 2004). Die akute Form wird oftmals zwischen dem dritten und sechsten Lebenstag auffällig, kann schwere Stoffwechselkrisen verursachen und unbehandelt zum Tode führen. Wird die Krise überlebt, entspricht der Verlauf im Wesentlichen dem der chronisch intermittierenden Form. Bei dieser Form, die unter normalen Umständen asymptomatisch verlaufen kann, kommt es bei besonderen Belastungssituationen und bei stark proteinreicher Ernährung zu Stoffwechselkrisen. Diese sind gekennzeichnet durch Trinkschwäche, Erbrechen und Dehydratation bis hin zum Koma (Feinstein und O'Brien 2004, Wei et al 2004). Durch Krisen dieser Art kann die motorische und geistige Entwicklung beeinträchtigt werden.

Seit Einführung des Neugeborenen Screenings durch Tandemmassenspektrometrie ist es möglich, die IVA vor dem Auftreten von Symptomen zu diagnostizieren (Ensenauer et al 2004). Der Leitparameter, der dabei aus dem Trockenblut bestimmt wird, ist das (Iso)valeryl-Carnitin (C5). Im Falle der Diagnose und dem Einsetzen von Symptomen steht eine

suffiziente Therapie (Unterbrechung der Proteinzufuhr und Gabe von Glucoseinfusionen bei akuten Krisen) zur Verfügung. Die eventuell vorhandene Azidose kann durch Zufuhr von Bikarbonaten bekämpft werden. Sowohl während schwerer Krisen als auch auf lange Sicht ist die Gabe von Glycin und Carnitin sinnvoll, um die Ausscheidung von Isovaleriansäure zu unterstützen. Eine leucinarme Diät wird empfohlen (Liebl et al. 2002).

Der 3-MCC-Mangel beruht auf einer Störung des biotinabhängigen Enzyms 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, welches am Abbau der essentiellen Aminosäure Leucin beteiligt ist. Die Enzymdefizienz führt zur Anhäufung von 3-Methylcrotonyl-CoA, was eine vermehrte Ausscheidung von 3-Hydroxyisovaleriansäure und auch 3-Methylcrotonylglycin nach sich zieht. 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin (3-HIVA-Carnitin) ist der quantitativ bedeutsamste pathologische Metabolit (Liebl et al. 2002).

Seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie hat der 3-MCC-Mangel massiv an Bedeutung gewonnen, da die Störung des Enzyms 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase seit Einführung dieser Methode wiederholt und weitaus öfter als erwartet diagnostiziert wurde. Tatsächlich belegen Daten aus den USA, Australien und Deutschland, dass diese Störung die häufigste organische Azidämie ist (Liebl et al. 2002, Baumgarten et al. 2001). Der 3-MCC-Mangel weist ein äußerst variables klinisches Erscheinungsbild (Baumgarten et al. 2001, Liebl et al. 2002, Koeberl et al. 2003) auf. So zeigen auch Mitglieder einer Familie sehr verschieden starke klinische Symptome (Visser et al. 2000, Koeberl et al. 2003), wobei das Spektrum von völliger lebenslanger Symptombefreiheit bis hin zu akuten encephalopathischen oder myopathischen Symptomen reicht. Leitparameter im Neugeborenen Screening ist 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin (C5-OH). Die Bestätigungsdiagnostik erfolgt durch die Bestimmung von 3-HIVA in Vollblut und Plasma, sowie die Bestimmung der organischen Säuren im Urin mittels GC-MS (Liebl et al. 2002). Die mögliche Therapie basiert hauptsächlich auf Prävention und entspricht bei schweren Verläufen im Wesentlichen der Therapie bei IVA.

b) Glutaracidurie Typ I und II (GA I und GA II)

Die GA I wird verursacht durch einen Defekt des Enzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase. Die Substratumsetzung dieses Enzyms ist abhängig von FAD, einem Abkömmling des Riboflavins (Liebl et al. 2002). Dieses ist verantwortlich für den Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan. Leitparameter im Neugeborenen Screening ist das Glutaryl-Carnitin (C5-DC). Wie bei den zuvor beschriebenen Erkrankungen kann eine Stoffwechselkrise bei GA I durch Hungerphasen oder Infekte ausgelöst werden. Die

Häufigkeit liegt bei ca. 1:100.000. Die Erkrankung kann bereits zum Zeitpunkt der Geburt durch einen Makrocephalus auffallen. Weitere typische Symptome im Verlauf sind eine im MRT oder CT nachweisbare fronto-temporale Hirnatrophie und eine choreathetotische dystone Bewegungsstörung (Voll et al. 1993). Betroffene Kinder können unter Umständen weder sprechen noch sitzen oder laufen, während die Intelligenz unbeeinträchtigt bleibt. Meistens ist die Entwicklung bis zum Alter von zwölf Monaten unauffällig. Erst dann treten, oftmals in Folge von Infekten, Symptome einer schweren Krise auf. Untersuchungen von Bjugstad et al. (2000) ergaben, dass, wenn dem Auftreten von motorischen Symptomen keine Erkrankung vorangeht, die Schwere der motorischen Symptome und des allgemeinen Krankheitsbildes signifikant mit dem Alter der Patienten assoziiert ist. Bei Patienten, bei denen die Erkrankung durch einen Infekt ausgelöst wurde, hatte das Alter bei Einsetzen der Symptomatik keinen Einfluss auf die Schwere des klinischen Krankheitsbildes. Studien deuten darauf hin, dass eine Behandlung vor Einsetzen der Symptomatik das Eintreten selbiger verhindern oder verzögern kann (Bjugstad et al. 2000).

Die Behandlung erfolgt durch Carnitingaben sowie eine lysin- und tryptophanarme Diät. Die Prognose ist bei präventiver Behandlung gut, während bei bereits erkrankten Patienten, trotz langsamer Verbesserungen unter Therapie, oftmals keine vollständige Genesung von der neurologischen Krise möglich ist und eine neurologische Erkrankung beträchtlichen Ausmaßes zurückbleibt (Smith et al. 2001).

Die GA II (OMIM 231680) wird neuer und richtiger als Multipler Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MAD-Mangel) bezeichnet und den Fettsäureoxidaations-Defekten zugeordnet. Mutationen im Elektronentransfer-Flavoprotein (ETF) und der zugehörigen Dehydrogenase sind die Basis des MAD-Mangels. Diese Erkrankung wird verursacht durch verschiedene Mutationen, die in klarem Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung stehen (Olsen et al. 2003). Dies beeinträchtigt nicht nur die Fettsäureoxidation, sondern auch verschiedene Dehydrogenasen im Abbau der verzweigtkettiger Aminosäuren und des Lysins, sowie die Oxidation von Lactat. Die Behandlung erfolgt gegebenenfalls mit Riboflavin (Liebl et al. 2002, Zschocke und Hoffmann 2002).

c) Die Propionacidurie (PPA) und die Methylmalonacidurie (MMA)

Diese Erkrankungen stellen Störungen im Abbau der Aminosäuren Valin, Threonin, Isoleucin und Methionin dar sowie im Abbau von Fettsäuren mit ungeradzahlicher Kettenlänge und beim Abbau von Cholesterin. Die Häufigkeit beträgt sowohl für die PPA als auch für die MMA ca.

1:100.000. Im Neugeborenen Screening ist es nicht möglich, zwischen den beiden Störungen zu unterscheiden, da der Leitparameter Propionyl-Carnitin (C3) gleich ist (Liebl et al 2002). Die PPA beruht auf dem Defekt der biotinabhängigen Propionyl-CoA-Carboxylase. Diese katalysiert die Umwandlung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA. Die MMA beruht auf einem Defekt des folgenden Abbauschrittes in der Stoffwechselkaskade, der Umwandlung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA. Dieser Schritt wird von der Methylmalonyl-CoA-Mutase katalysiert, die Adenosylcobalamin als Cofaktor benötigt (Liebl et al 2002). Von der PPA Betroffene sind bei der Geburt klinisch unauffällig. Es existieren bei dieser Erkrankung zwei Erscheinungsformen, die akute neonatale und die chronisch-intermittierende Form. Untersuchungen an europäischen Betroffenen belegen, dass die akute neonatale Form häufiger ist. Im Report von Sass et al. (2004) litten 86% der PPA-Patienten an dieser früh einsetzenden Variante der Krankheit und entwickelten innerhalb der ersten 90 Lebensstage Symptome. Die Mortalitätsrate der PPA beträgt laut dieses Reports ca. ein Drittel. Die Symptome, die die PPA in der akuten Krise verursacht, sind eher unspezifisch (Trinkschwäche, Erbrechen, muskuläre Hypotonie und Lethargie bis zum Koma). Die Therapie besteht in eiweißarmer Ernährung inklusive vorstufenfreier Aminosäuremischungen sowie Carnitin, um die Ausscheidung der angestauten Metabolite über den Harn zu steigern. Während akuten Krisen ist die vollständige Unterbrechung der Proteinzufuhr und die Verabreichung von Glucoseinfusionen notwendig. Auch bei konsequenter Therapie lassen sich neurologische Schäden nicht vollständig vermeiden (Liebl et al 2002).

Besondere Beachtung verdienen Fälle, die erst spät manifest werden (z.B. im Zusammenhang mit Infektionen), da sie bis zum Tode führen können. Erst spät auftretende Fälle sollten deshalb in die Differentialdiagnostik von ungeklärtem Koma einbezogen werden (Lucke et al. 2004). Ist bei einem Patienten die Erkrankung an PPA bekannt, sind ständige Überwachung und Kontrollen notwendig. Dazu werden wiederholte Bestimmungen des C3 mittels Tandemmassenspektrometrie und Bestimmungen der organischen Säuren im Urin herangezogen. Es gibt Hinweise, dass die Bestimmung der verzweigtkettigen Fettsäuren aus der Phosphatidylethanolamin-Fraktion der Erythrozytenlipide bei der Langzeitbeobachtung der PPA nützlich ist (Meissner et al. 2004).

Die Symptome und die Therapie der MMA entsprechen weitgehend denen der PPA. Genau wie bei dieser existieren bei der MMA eine akute neonatale und eine chronisch intermittierende Form. Des Weiteren gibt es Patienten mit partiellem Mutasemangel oder gestörter Cofaktorsynthese. Beim völligen Fehlen des Enzyms Methylmalonyl-CoA-Mutase müssen Todesfälle durch frühzeitige Therapie verhindert werden, wobei neurologische

Schäden oftmals unvermeidbar sind. In Fällen von gestörter Cofaktorsynthese können hochdosierte Vitamin-B12-Gaben helfen die Prognose zu verbessern (Liebl et al. 2002).

1.5.4 Harnstoffzyklusdefekte

Harnstoffzyklusdefekte gehören zu den häufigsten Stoffwechselerkrankungen (kumulative Inzidenz ca. 1:20.000). Typisch für die Erkrankung sind eine respiratorisch Alkalose im Frühstadium und eine Hyperammonämie. Bei Neugeborenen äußern sich Harnstoffzyklusdefekte ab dem zweiten Lebenstag durch Lethargie, Trinkschwäche Hyperventilation, Krampfanfälle, zunehmend schwere Enzephalopathie mit Koma, Temperaturlabilität oder Reflexverlust (Zschocke und Hoffmann 2002). Im weiteren Verlauf können Gedeihstörungen und neurologische Defizite auftreten. Erkrankungen aus dieser Gruppe sind z.B. die Citrullinämie, die durch einen Defekt des Enzyms Argininsuccinatsynthetase verursacht wird, die Argininbernsteinsäureerkrankung oder die Argininämie, die auf einem Defekt der Arginase beruht.

Weitere Erkrankungen aus dieser Gruppe finden sich in Anhang A1. Die Therapie der Störungen kann durch eine proteinreduzierte Diät und Verhinderung einer katabolen Stoffwechsellage erfolgen. In Notfallsituationen ist die Therapie der Hyperammonämie durch extrakorporale Entgiftung möglich. Momentan gehören die Harnstoffzyklusdefekte nicht zum Spektrum der empfohlenen Zielkrankheiten des Neugeborenencreening. Sowohl im Bereich der Diagnostik als auch der Nachsorge bestehen noch zu viele Unsicherheiten.

1.6 Ziele des Neugeborenencreenings

Durch Neugeborenencreening soll eine möglichst vollständige Erfassung aller Zielkrankheiten erfolgen. Der Umfang an empfohlenen Zielkrankheiten hat sich in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten immer wieder erweitert und wird mit großer Wahrscheinlichkeit auch in den folgenden Jahren und Jahrzehnten weiter zunehmen. Wie sich die erst kürzlich in jenen Kreis aufgenommen Krankheiten hinsichtlich Häufigkeit und klinischem Krankheitsbild darstellen, ist Gegenstand ständiger Forschung.

Abgesehen von den bereits jetzt zum Screening empfohlenen Erkrankungen, richtet sich das Augenmerk von Forschung, aber auch von Politik und Wirtschaft, auf die Erkrankungen, die eventuell in der Zukunft zum Spektrum der Zielkrankheiten gehören. Besonders von Interesse sind in dieser Hinsicht alle Arten von Stoffwechselerkrankungen, die mittels Tandemmassenspektrometrie entdeckt werden können.

2. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die Ergebnisse des Erweiterten Neugeborenencreenings in Thüringen im Untersuchungszeitraum von 01.11.2001 bis 31.12.2003 unter besonderer Berücksichtigung der aktuellen Screeningrichtlinien zu geben und die vorliegenden Resultate im nationalen und internationalen Vergleich zu analysieren, um daraus potentielle Verbesserungsmöglichkeiten abzuleiten.

Einen Schwerpunkt bildet der Vergleich der Ergebnisse des Neugeborenencreenings in Thüringen vor und nach Einführung der Tandemmassenspektrometrie. Dabei werden in dieser Arbeit nur die Stoffwechselerkrankungen erfasst, für die sowohl die Bestätigungsdiagnostik als auch die Behandlung zentralisiert in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin Jena durchgeführt wurde. Diese Klinik ist das Thüringer Kompetenzzentrum zur Behandlung angeborener Stoffwechselerkrankungen. Die Behandlung endokrinologischer Erkrankungen (Hypothyreose, Adrenogenitales Syndrom/ AGS) erfolgt hingegen dezentral und wird in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Das Neugeborenencreening durch Tandemmassenspektrometrie (TMS) wird hinsichtlich der Ansprüche an das Neugeborenencreening analysiert.

Die allgemein anerkannten Anforderungen an ein Neugeborenencreening umfassen folgende Forderungen:

1. Es sollte sich bei den untersuchten Erkrankungen um Störungen mit einer Inzidenz $>1:100.000$ handeln. Es sei denn, sie werden im Rahmen eines kombinierten Tests mit gescreent.
2. Die Stoffwechselstörung sollte einen bekannten Krankheitswert aufweisen, da es nicht sinnvoll wäre, auf symptomlose Stoffwechselstörungen („Non-Disease“) zu untersuchen.
3. Es muss eine erfolgreiche Therapie verfügbar sein.
4. Als Screeningtest soll eine zuverlässige Methode mit hoher Effizienz vorhanden sein (Trockenblutproben auf Filterkarten).
5. Zur Sicherung eines auffälligen Befundes müssen differentialdiagnostische Verfahren zur weiteren Abklärung (Folgediagnostik) zur Verfügung stehen (Seidel et al. 2002).

Des Weiteren wird betrachtet, welche Faktoren (z. B. das Gestationsalter zur Geburt) Einfluss auf die Ergebnisse des Neugeborenencreenings haben. Soweit es der aktuelle Kenntnisstand erlaubt, wird das Erweiterte Neugeborenencreening hinsichtlich des Kosten-Nutzenverhältnisses beurteilt.

3. Material und Methoden

3.1 Ablauf des Neugeborenen Screenings

Der Ablauf des Neugeborenen Screenings ist durch Gesetze und Anweisungen der zuständigen Screeningkommission festgelegt. Es sollte in allen Institutionen und bei allen Neugeborenen in gleicher Art und Weise erfolgen. Alle verwendeten Materialien wurden durch die im Folgenden beschriebenen Schritte gewonnen. In der Präanalytik und der Organisation der Abläufe waren Standardisierung und größte Sorgfalt notwendig.

Die Präanalytik umfasste dabei:

- die vorschriftsmäßige Abnahme und Behandlung des Untersuchungsmaterials, so wie in den Screeningrichtlinien vorgegeben,
- den termingerechten und ordnungsgemäßen Versand der Testproben ins Screeninglabor des Thüringer Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (TLLV) in Erfurt bzw. ins Neugeborenen Screeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig für die Durchführung der Tandemmassenspektrometrie,
- die Erfassung aller notwendigen Angaben zum Kind und dem Schwangerschaftsverlauf

Am dritten Lebenstag (frühestens nach Vollendung der 36. Lebensstunde) sollte jedem Neugeborenen nach Aufklärung und Zustimmung der Eltern Blut entnommen werden. Für Frühgeborene und kranke Neugeborene sind zusätzliche Blutentnahmen erforderlich. Die Blutentnahme für das Neugeborenen Screening erfolgt durch einen kurzen Einstich in die Ferse des Säuglings mit Hilfe einer sterilen Lanzette. Danach werden sechs vorgegebene Kreise auf einer standardisierten Testkarte durch Blutstropfen völlig durchtränkt und anschließend getrocknet. Ein Übereinandertropfen ist wegen der Additionseffekte nicht zulässig. Die Trockenblutkarte wird an die entsprechenden Screeninglabors verschickt.

Bei auffälligem Erstscreening wird ein Zweitscreening (Recall) veranlasst. Sollte die erste Blutprobe deutlich auffällig sein, kann schon hier eine Überweisung an das zuständige Behandlungszentrum erfolgen, um eine Therapieverzögerung zu vermeiden. Dann wird das Recall gemeinsam mit der Bestätigungsdiagnostik im Behandlungszentrum durchgeführt.

Ist auch das Recall auffällig, wird der Einsender informiert und das entsprechende Kind in ein Behandlungszentrum (Thüringen: das Kompetenzzentrum zur Behandlung stoffwechselkranker Kinder an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena) eingewiesen. Hier wird eine weiterführende Diagnostik (Folgediagnostik/ Bestätigungsdiagnostik) und bei Bedarf eine adäquate Behandlung und Therapieüberwachung

eingeleitet. Des Weiteren kommen auch dem Follow up, d.h. der Behandlung auffälliger Kinder und der Beratung der betroffenen Eltern größte Bedeutung zu. Die Verantwortung hierfür trägt ebenfalls das Kompetenzzentrum.

Die Laboruntersuchungen hinsichtlich PKU, Galaktosämie und Biotinidase wurden vom TLLV in Erfurt durchgeführt. Das am 01.11.2001 begonnene Screening mittels Tandemmassenspektrometrie fand im Neugeborenencreeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig statt. Seit Mai 2005 liegt der gesamte mit Laborleistungen in Zusammenhang stehende Teil des Neugeborenencreenings in den Händen des Labors Leipzig.

3.2 Labormethoden

3.2.1 PKU

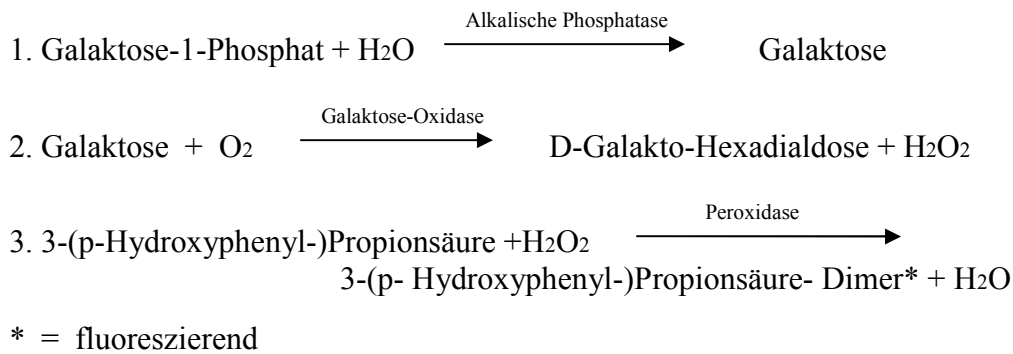
Das Screening auf PKU, welches auch die nicht therapiebedürftige HPA erfasst, wurde bis Oktober 2001 mit Hilfe des fluorimetrischen Tests „Phenylalanin Neonatal“ der Firma Seramun Diagnostica GmbH durchgeführt. Dieser lief wie folgt ab:

Ein Filterpapierplättchen mit maximal 5mm Durchmesser wird ausgestanzt und in eine Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wird Elutionslösung und danach Ethanol zugegeben. Die Eluate werden auf eine weiße Mikrotiterplatte zur Fluoreszenzmessung überführt. Schließlich wird ein Reaktionsgemisch, bestehend aus Succinatpuffer, L-Leucyl-L-Alanin und Ninhydrin, zugegeben. Nach dem Schütteln und Inkubieren wird die Mikrotiterplatte im Fluorometer bei 390nm Anregungswellenlänge und 485nm Emissionswellenlänge gemessen. Seit Oktober 2001 erfolgt auch die Phenylalanin-Bestimmung mittels der Tandemmassenspektrometrie.

3.2.2 Galaktosämie

Zur Analyse der zwischen dem 01.01.1997 und dem 10.09.2003 entnommenen Trockenblutproben wurde der Galaktose Neonatal Test von der Seramun Diagnostica GmbH zur quantitativen Bestimmung von Galaktose und Galaktose-1-Phosphat eingesetzt.

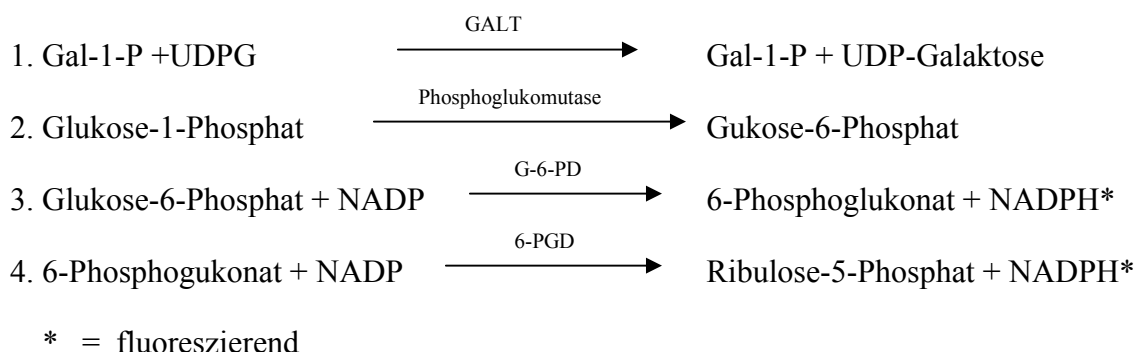
Testablauf: Galaktose wird aus den getrockneten Blutproben eluiert und mit Sauerstoff mittels Galaktose-Oxidase in Hexodialdose und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Mittels Peroxidase erfolgt die Transformation des Wasserstoffperoxids, mit einem als Wasserstoffdonator fungierenden Fluorogen, in ein fluoreszierendes Produkt und Wasser.



Die Fluoreszenz wird nach dem Stoppen der Reaktion bei einer Wellenlänge von 405nm mit dem Fluorometer gemessen. Die Anregungswellenlänge beträgt 320nm. Ist dieser Test auffällig oder grenzwertig (Galaktosekonzentration > 11mg/dl) oder sind die Kinder älter als drei Tage, wird der sogenannte Beutler-Test durchgeführt.

Dieser läuft wie folgt ab: Nach dem Ausstanzen der Probe wird das zu messende Enzym (Gal-1-PUT) unter Hämolyse aus der Trockenblutprobe herausgelöst. Dem Enzym wird das Substrat Gal-1-P zusammen mit UDP-Glukose angeboten. Das entstehende Glu-1-P wird durch das hämolysateigene Enzym Phosphoglucomutase in Glu-6-P umgewandelt. In einer anschließenden Indikatorreaktion wird NADP⁺ durch Dehydrogenasen in NADPH überführt. Das entstandene NADPH fluoresziert im langwelligen UV-Licht. Die Intensität der Fluoreszenz verhält sich proportional zur Gal-1-PUT-Aktivität der Probe. Zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz, ist der Test negativ (vom Labor kenntlich gemacht durch +++++, +++ oder ++). Bei geringer oder fehlender Fluoreszenz ist der Befund positiv (+, 0).

Ab dem 11.09.2003 bis zum Ende des Erfassungszeitraums am 31.12.2003 wurden die Blutproben nur auf einen Aktivitätsmangel der Gal-1-PUT untersucht. Dabei kam der Neonatal GALT Test von PerkinElmer Life Sciences zum Einsatz :



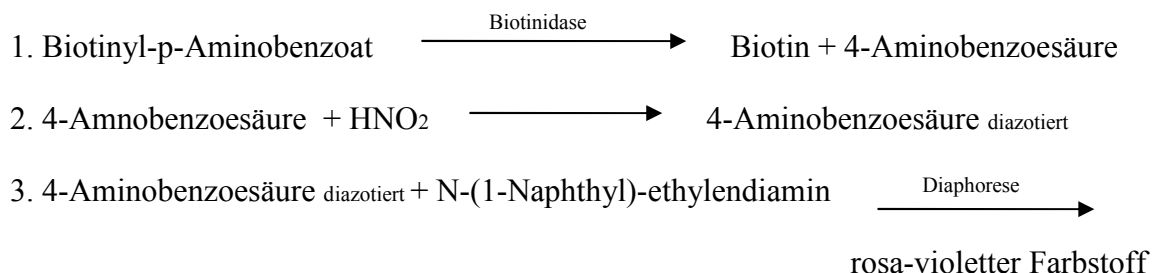
Der PerkinElmer GALT-Test ist eine Adaptation des enzymatischen Tests von Beutler und Baluda. Die Reaktionsfolge des GALT-Tests ist mit dem zuvor beschriebenen Beutler-Test vergleichbar. Nach Zugabe von rekonstruiertem GALT-Substrat-Reagenz zu den zuvor ausgestanzten Filterpapierscheibchen wird das Gemisch inkubiert. Anschließend wird mit

Äthanol ausgefällt und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 355nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm gemessen. Der Cut-Off-Wert liegt bei 3,1 GAL-1-PUT U/g Hb. Zur Optimierung der Ergebnisse wurde ein unbestimmter Bereich zwischen 2,5 und 3,5 Gal-1-PUT U/g Hb festgelegt. Folglich werden Proben von 2,4 und darunter als positiv und Proben von über 3,5 als negativ gewertet. Proben mit Ergebnissen im unbestimmten Bereich werden erneut getestet, um die Anzahl an falsch Positiven bzw. falsch Negativen zu reduzieren (Gebrauchsinformation Neonatal GALT von Perkin Elmer).

3.2.3 Biotinidase

Im Screening auf Biotinidasemangel gab es im betrachteten Zeitraum keine Veränderungen. Laut den zugehörigen Gebrauchsinformationen läuft der Test wie folgt ab:

Auf das Substrat p-Aminobenzoessäure-Biotin wirkt das Enzym Biotinidase (aus Thrombozyten) ein. P-Aminobenzoessäure (p-AMS) und Biotin werden voneinander getrennt. Die entstandene p-AMS wird durch die so genannte Bratton-Marshall Reaktion nachgewiesen. P-ABS geht dabei durch Zugabe eines Diazoreagens in einen lilafarbenen Komplex über. Bei deutlicher Lilafärbung liegt normale Biotinidaseaktivität vor, während schwache oder fehlende Färbungen als pathologisch gelten.



Die Extinktionsmessung erfolgt photometrisch. Die Endauswertung erfolgt letztlich mit Hilfe eines Computerprogramms. Nach Berechnung des Mittelwertes aller Extinktionen des Tagesansatzes ergibt sich der 100%-ige Wert für die Biotinidaseaktivität. Bezogen auf diese Aktivität wird anschließend die Biotinidaseaktivität jeder einzelnen Probe berechnet. Der Cut-Off-Wert liegt in diesem Verfahren bei > 35% Aktivität. Werte > 36% entsprechen folglich einem unauffälligen Befund. Bei Werten kleiner oder gleich 36% erfolgt die Neutestung der Probe. Werte kleiner oder gleich 35% gelten als auffällig. In solchen Fällen erfolgt die Anforderung einer neuen Probe zur Sicherung des Befundes. Insgesamt werden positive Ergebnisse wie folgt eingeteilt:

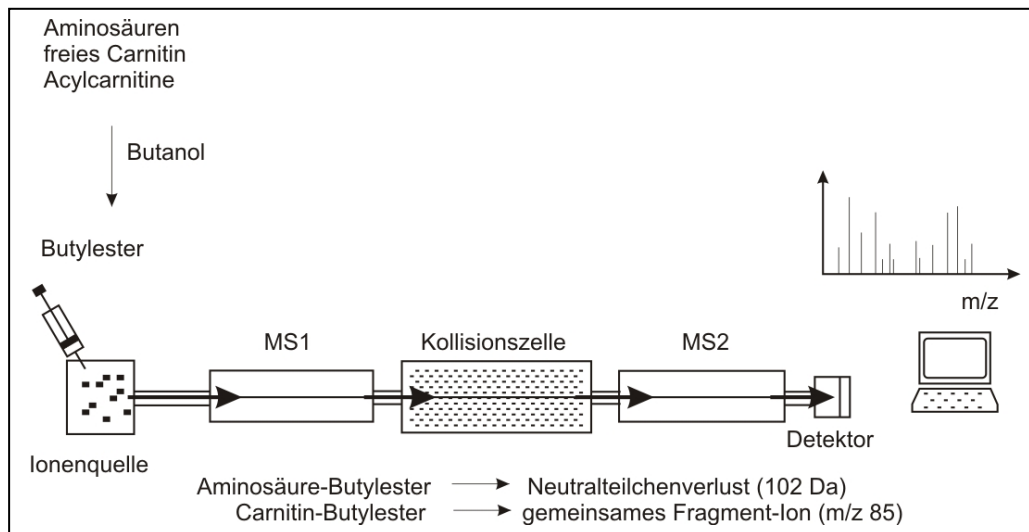
| | | |
|----------------|---|--------------------------------|
| Wert 35% - 15% | = | Biotinidase vermindert |
| Wert 14% - 5% | = | Biotinidase stark vermindert |
| Wert < 5% | = | Biotinidase nicht nachgewiesen |

3.2.4 Tandemmassenspektrometrie (TMS)

Die Tandemmassenspektrometrie ermöglicht einen hohen Probendurchsatz, einen geringen Probenverbrauch und eine vereinfachte Probenvorbereitung. Durch die Tandem-Technik wurde das Problem der klassischen Massenspektrometrie gelöst, das darin bestand, dass chemisch unterschiedliche, aber massengleiche Teilchen simultan detektiert werden und ein gemeinsames Signal ergeben (Liebl et al. 2002). Beim Tandemmassenspektrometer, (Abbildung 4), sind zwei Massenspektrometer miteinander gekoppelt. Im ersten Massenspektrometer bewirkt ein Hochfrequenzfeld, dass Ionen massenabhängig in Schwingung versetzt werden. Abhängig vom angelegten Hochfrequenzfeld können nun nur Ionen einer bestimmten Masse passieren. Anschließend gelangen die selektierten Moleküle in eine Kollisionszelle, in der sich ein gering konzentriertes Inertgas befindet. Dort zerfallen sie aufgrund der Stoßenergie bei der Kollision mit den Gasmolekülen in spezifische Bruchstücke (Roscher et al. 2001). Da Acylcarnitine und Aminosäuren verschiedene und auch unterschiedlich schwere Bruchstücke erzeugen, ist durch diese Methode eine Zuordnung der bereits nach Masse getrennten Moleküle in die jeweiligen Stoffgruppen möglich. Die meisten Aminosäuren setzen ein neutrales Teilchen von 102 Da frei, während bei den Acylcarnitinen ein gemeinsames Fragment-Ion von 85 Da entsteht (Böhles et al. 2002, Chace et al. 2003, Schulze et al. 2003). Durch die massenspezifische Selektion und den molekültypischen Zerfall entfällt damit die Notwendigkeit einer Vortrennung. Die in der Kollisionszelle entstandenen Ionenfragmente werden in der zweiten analytischen Einheit (MS 2) getrennt und anschließend detektiert (Liebl et al. 2002).

Dieses Screening der Thüringer Proben wurde während des untersuchten Zeitraums durch das Neugeborenencreeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig durchgeführt. Das verwendete Massenspektrometer ist ein API 2000 von SCIEX (ABI) mit Turbo-Ionenspray. Bevor der eigentliche Screeningprozess beginnt, werden die Analyte aus den Trockenblutproben (3mm) mittels methanolischer Lösung, die interne Standards enthält, bei Raumtemperatur extrahiert (Ceglarek et al. 2002). Anschließend werden sie mit Hilfe von butanolischer Salzsäure in die korrespondierenden Butylester überführt. Diese werden direkt in das Gerät eingespritzt (Liebl et al. 2002).

Abbildung 4: Prinzip der Tandemmassenspektrometrie



modifiziert nach Screeninghandbuch APS 2002, Prinzip der Tandemmassenspektrometrie, MS = Massenspektrometer, Da = Dalton, m = Masse, z = Zeit

Ein Massenspektrometer identifiziert bzw. detektiert das Gewicht von individuellen Molekülen und deren Fragmenten. Die Resultate werden schließlich in Form eines Graphen dargestellt, bekannt als das Massenspektrum. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel für einen Graphen, dessen Massenspektrum auf eine Abbaustörung der mittelkettigen Fettsäuren, einen MCAD-Mangel, hinweist.

Weitere Vorteile der Tandemmassenspektrometrie liegen in:

- der extrem kurzen Analysezeit (1-2min),
- der höheren Spezifität im Vergleich zu anderen Methoden (Ermittlung des Verhältnisses einzelner Metabolite zueinander),
- der Tatsache, dass für die Analyse vieler Moleküle nur eine Labormethode notwendig ist,
- dass die methodischen Vorteile in ihrer Konsequenz eine Vorverlegung des NGS auf den dritten Lebensstag ermöglichen (Seidel et al. 2002; Stach et al 2002; Chace et al. 2003,).

Abbildung 5: Beispiel für ein Massenspektrum

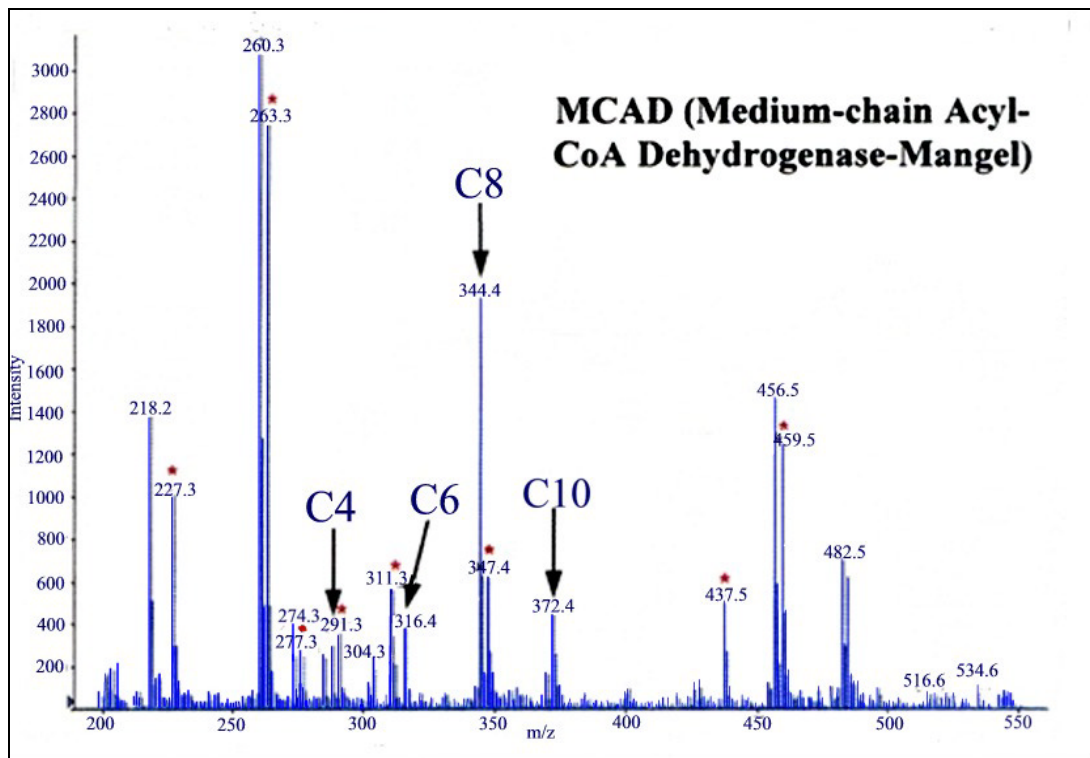


Abbildung nach Böhles et al. 2002, übersetzt und leicht modifiziert; Das Massenspektrometer zeigt einen für MCAD-Mangel verdächtigen Befund. Die Werte der x-Achse stehen für die Masse des Analyten in der Probe, die festgelegt wird durch das Verhältnis des bekannten internen Standards zum unbekannten Analyten (m/z), während die erreichten Ausschläge entlang der y-Achse für die Menge des jeweiligen Ions stehen (Chace et al. 2003). C4 = Butyryl-Carnitin, C6 = Hexanoyl-Carnitin, C8 = Octanoyl-Carnitin, C10 = Decanoyl-Carnitin, m = Masse, z = Zeit

3.3 Analyse der Labordaten

Die Untersuchung der Ergebnisse des Thüringer Neugeborenencreenings wurde retrospektiv in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena, in der Abteilung klinische Genetik, in Zusammenarbeit mit dem TLLV durchgeführt. Es wurde der Zeitraum zwischen dem 01.01.1997 und dem 31.12.2003 erfasst.

3.3.1 Erfassung der in Thüringen auffälligen Befunde

Die durchgeführten Untersuchungen beziehen sich auf 118.854 im oben genannten Zeitraum lebendgeborene Kinder. Bei 111.845 dieser Lebendgeborenen wurde in Thüringen ein Neugeborenencreening durchgeführt (Tabelle 2). Besonders wurde betrachtet, für welche Erkrankungen bzw. Screeningparameter die Kinder im Screening auffällig waren (Tabellen 2, 4, 10 und 11). Wurden die Kinder vor der Erweiterung des Screenings im November 2001 geboren, können sich die auffälligen Resultate nur auf drei Stoffwechselerkrankungen beziehen, die PKU, die Galaktosämie und den Biotinidasemangel. Wurden die Kinder nach

dem 31.10.2001 geboren und deren Trockenblutproben damit tandemmassenspektrometrisch untersucht (*Erweitertes Neugeborenencreening*), kommt ein erheblich größeres Spektrum an möglichen Diagnosen in Betracht. Alle diese Daten wurden retrospektiv ermittelt.

Die Erfassung der Screeningergebnisse, die sich auf den Zeitraum vom 01.01.1997 bis zu 31.10.2001 beziehen, wurde mit Hilfe des TLLV Erfurt durchgeführt. Es wurde die Art und die Anzahl auffälliger Erstscreeningbefunde, auffälliger Zweitscreeningbefunde und bestätigter Diagnosen ermittelt. Bei bestätigten Fällen wurden Initialen und Geburtsdatum ermittelt, um die notwendigen Angaben über Krankheitsverlauf, Folgeuntersuchungen sowie gesicherte Diagnose den Akten und Aufzeichnungen im zuständigen Kompetenzzentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Jena zu entnehmen. Genauso wurde bezüglich der Daten der konventionellen Screeningmethoden verfahren, die ab dem 01.11.2001 erfasst wurden. Diese Verfahrensweise wurde nach Prüfung durch den Datenschutzbeauftragten des Thüringer Ministeriums für Soziales und Gesundheit für unbedenklich erklärt, da die Patienten in der Universitätsklinik für Kinder und Jugendmedizin Jena als Kompetenzzentrum bereits registriert waren und dieses Verfahren nur der Wiederfindung von Daten diene.

Die Daten bezüglich der Resultate der Tandemmassenspektrometrie entstammen primär den im Jenaer Kompetenzzentrum vorliegenden Rückrufprotokollen. Aus diesen Protokollen gehen Name, Vorname, Geburtsdatum, der Tag der Blutentnahme sowie die auffälligen Metabolite und die Verdachtsdiagnose hervor. Diese Angaben wurden nachträglich mit den Daten des Neugeborenencreeninglabors des Universitätsklinikums Leipzig abgeglichen. Auch hier wurde Art und Anzahl der auffälligen Erstscreenings, der auffälligen Zweitscreenings und bestätigten Diagnosen ermittelt. Bestätigte Fälle wurden anschließend gesondert betrachtet. Dazu standen die Akten des Kompetenzzentrums für Kinder- und Jugendmedizin zur Verfügung.

Die ermittelten Werte wurden mit dem Programm Exel 2000 erfasst und anschließend entsprechend den verschiedenen Krankheitsgruppen (Aminoazidopathien, Fettsäurestoffwechselstörungen, Organoazidopathien, Harnstoffzyklusdefekte) neu geordnet, um die Übersichtlichkeit zu verbessern. Dabei wurde jedem Patienten eine Patientennummer zugewiesen, um die Daten in anonymisierter Form weiter zu verarbeiten. Für die Daten, die sich auf die Erkrankungen PKU, MCAD-Mangel, Tyrosinämie und Galaktosämie beziehen, wurden extra Tabellen angelegt und diese anschließend in das Statistikprogramm SPSS (Statistical Product and Service Solutions von SPSS Inc.) 12.0.1 importiert und dort analysiert.

Die Daten über Ablauf, Labormethoden und Geräte basieren auf Angaben des jeweils zuständigen Screeninglabors (TLLV und Neugeborenencreeninglabor Leipzig) sowie den Arbeitsanweisungen der verwendeten Test Kits (zum Screening auf PKU, Galaktosämie und Biotinidase). Die entsprechenden Arbeitsanweisungen wurden vom TLLV zur Verfügung gestellt. Die Angaben zur Anzahl an Lebendgeburten in den jeweiligen Jahren wurden nach Rücksprache vom Thüringer Landesamt für Statistik zur Verfügung gestellt.

3.4 Sensitivität, Spezifität und Positiver Vorhersagewert des Neugeborenencreenings

Die **Sensitivität** entspricht dem Anteil an Kranken, der durch das Neugeborenencreening erkannt wird. Die **Spezifität** ist der Teil der Individuen, die als gesund erkannt werden (Pollitt et al. 1997). Ziel ist es, möglichst viele (alle) Erkrankte zu finden, bei möglichst wenig falsch Positiven. Es muss stets ein Kompromiss zwischen hoher Sensitivität und hoher Spezifität eingegangen werden. Zu diesem Zweck legt man beim Neugeborenencreening Cut-Off-Werte für die einzelnen Screeningparameter fest und versucht beständig die vorhandenen Tests zu verbessern. Bereits vorhandene werden durch effektivere Testverfahren ersetzt.

Ein weiterer wichtiger Wert, um einen Test zu beurteilen, ist der „**positive Vorhersagewert**“. Anders als Sensitivität und Spezifität steht er in Zusammenhang mit der Häufigkeit einer Erkrankung in der Bevölkerung. Er hat den Vorteil, das „Gute“ eines Tests, d.h. die gefundenen Fälle, mit dem Negativen, den falsch positiven Fällen, zu vergleichen (Pollitt et al. 1997). Sensitivität und Spezifität als auch der Positive Vorhersagewert können allgemein für das gesamte Neugeborenencreening berechnet werden. Diese Angaben setzen sich aus Sensitivitäten, Spezifitäten und positiven Vorhersagewerten der einzelnen angewandten Labormethoden zusammen. Soweit es die Tandemmassenspektrometrie betrifft, lassen sich die entsprechenden Werte auch für jeden Screeningparameter einzeln berechnen.

3.4.1 Fluorometrische Methode zur Phenylalaninbestimmung

Für das fluorometrische Verfahren zur Bestimmung des Phenylalanins gilt dabei Folgendes: Der Cut-Off-Wert wurde bei 2mg/dl festgesetzt und für diesen Wert optimiert. Der Nachweis von Phenylalanin erfolgt durch die Fluoreszenz des Phenylalanin-Ninhydrin-Produktes bei einer bestimmten Wellenlänge (Arbeitsanweisung Phenylalanin Neonatal, Seramun Diagnostica, Stand: 1999). Phenylalanin wird quantitativ aus Trockenblut bestimmt, unabhängig von der Gegenwart anderer Aminosäuren. Die Messung wird automatisiert durchgeführt (Morgenthaler 2004), wobei allerdings nur ein Substrat gemessen wird (Dougherty und Levy, 1999). Die Genauigkeit des Verfahrens ist dabei vom Zeitpunkt der Blutentnahme abhängig.

3.4.2 Galaktosämie

Zum Screening auf Galaktosämie wurde in Thüringen bis September 2003 die Gesamtgalaktosekonzentration im Trockenblut verwendet. Dieser Wert beinhaltet Galaktose-1-Phosphat und freie Galaktose. Für Grenzbefunde und pathologische Befunde sowie in allen Fällen eines Screenings innerhalb der ersten acht Lebensstunden stand zusätzlich die Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität zur Verfügung (Seidel et al. 2002). Ab dem 11.09.2003 wurde in Thüringen ausschließlich die Gal-1-PUT-Aktivitätsmessung angewandt und ausschließlich auf die klassische Galaktosämie gescreent. Die Genauigkeit der Gal-1-PUT-Aktivitätsmessung ist weitgehend unabhängig vom Entnahmepunkt der Trockenblutprobe. Nach den neuen, vom Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen erlassenen Richtlinien, die seit dem 01.04.2005 gelten, sollen beide Screeningmethoden parallel eingesetzt werden. Durch die Kombination der Informationen aus zwei Screeningverfahren sollen Optimierungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erzielt werden.

Das Enzym Gal-1-PUT ist empfindlich gegenüber Wärmeeinwirkung. Eine solche entsteht durch Sonneneinwirkung bzw. hohe Temperaturen beim Trocknen der Karte oder während des Versands. Genau wie bei Verunreinigungen durch Desinfektionsmittel kann dies zur Inaktivierung und damit zu einem falsch positiven Testergebnis führen (Liebl et al. 2002). Zur Differenzierung dieses Ergebnisses kann die Galaktosemessung herangezogen werden, die prinzipiell von der Laktosezufuhr mit der Nahrung abhängt. Allerdings weisen auch nicht gestillte Neugeborene mit klassischer Galaktosämie in der Regel erhöhte Galaktose und Galaktose-1-Phosphatkonzentrationen auf. Die Kontamination einer Testkarte mit Milch oder Milchzubereitungen, Hyperalimentationen (hohe Laktosezufuhr mit der Nahrung) oder arteriovenöse Fehlbildungen der Leber können ein falsch positives Testergebnis bedingen (Liebl et al. 2002). Kommt es vor Abnahme der Screeningprobe zu einer Bluttransfusion, kann dies ein falsch negatives Ergebnis verursachen (Liebl et al. 2002).

3.4.3 Biotinidasemangel

Das Screening auf den Biotinidasemangel lief über den gesamten Erfassungszeitraum unverändert nach vorgenannter Methode ab. Auch nach den neuesten Richtlinien (seit 01.04.2005 gültig) sind in absehbarer Zukunft keine Veränderungen zu erwarten.

Genau wie im Falle der Gal-1-PUT handelt es sich bei der Biotinidase um ein wärmeempfindliches Enzym (Liebl et al. 2002). Durch Wärmeeinwirkung wie auch bei Verunreinigungen durch Desinfektionsmittel sind falsch positive Befunde möglich. Eine

Bluttransfusion vor Abnahme der Screeningprobe kann ein falsch negatives Ergebnis verursachen (Liebl et al. 2002).

3.4.4 Konventionelle Methoden und Tandemmassenspektrometrie (TMS)

Im dem für die Arbeit beobachteten Zeitraum wurden sowohl die konventionellen Screeningmethoden als auch die Tandemmassenspektrometrie angewendet und beobachtet. Vorangegangene Studien und Beobachtungen (Liebl et al. 2001a) kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Tandemmassenspektrometrie höher liegt als bei herkömmlichen Methoden. Eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität ist gleichbedeutend mit genaueren und damit besseren Ergebnissen. Um diese These für Thüringen zu bestätigen bzw. zu widerlegen, wurde ermittelt, wie viel Prozent der in Thüringen getesteten Kinder durch die jeweilige Methode auffällig wurden.

Ist ein Kind im Neugeborenen screening auffällig, entspricht dies einer Verdachtsdiagnose und das entsprechende Kind wird erneut getestet. Die Anzahl dieser Zweitscreenings entspricht der Recallrate, die sowohl für jede Labormethode insgesamt als auch für jeden in der Tandemmassenspektrometrie erfassten Screeningparameter ermittelt wurde.

$$RR = \text{Anzahl der auffälligen Kinder} \times 100 / \text{Anzahl der untersuchten Kinder}$$

Darauf basierend, wurde ermittelt, wie viel Prozent der Verdachtsdiagnosen sich bestätigten, also in die definitive Diagnose einer angeborenen Stoffwechselerkrankung übergingen. Des Weiteren wurde ermittelt, ob und wann wie viele erkrankte Kinder der jeweiligen Methode entgingen und erst später durch klinische Symptome auffällig wurden. Diese Fälle werden als falsch Negative bezeichnet.

Basierend auf diesen Daten, wurden Kreuztabellen erstellt und sowohl Sensitivität und Spezifität als auch der positive Vorhersagewert für jede angewandte Screeningmethode ermittelt. Soweit es die Tandemmassenspektrometrie betrifft, wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten sowohl für die Methode allgemein als auch für die jeweilig untersuchten Erkrankungsgruppen, bzw. für jede einzelne Erkrankung extra, ermittelt. Die ermittelten Ergebnisse wurden schließlich gegenübergestellt, verglichen und interpretiert.

Besonders beachtet werden muss, dass die meisten konventionellen Verfahren seit Jahren etabliert und erprobt sind, während hinsichtlich der Tandemmassenspektrometrie, die ersten beiden Jahre der Anwendung betrachtet werden. Mangelnde Erfahrung und am Beginn häufig bestehende Probleme im Ablauf von Präanalytik, Testdurchführung und Nachsorge wirken sich oftmals negativ auf Sensitivität und Spezifität aus.

Einfluss auf Sensitivität und Spezifität der Tandemmassenspektrometrie könne genau wie bei allen anderen Screeningverfahren, Verunreinigungen der Trockenblutkarten haben. Auch

Dialyse oder Bluttransfusionen bei untersuchten Kindern haben selbstverständlich Einfluss auf das Ergebnis. Verschiedene zu testende Parameter, wie z.B. Tyrosin, reagieren empfindlich auf eine Wärmeexposition der Proben. Die Sensitivität und Spezifität der TMS hängt also genau wie bei allen Verfahren mit äußeren Einflüssen und dem Ablauf der Präanalytik zusammen. Anders als bei den herkömmlichen Screeningverfahren haben bei der TMS aber auch die unterschiedlichsten Enzyme und deren Metaboliten (es kann theoretisch auf über 30 Erkrankungen untersucht werden) mit ihren eigenen Besonderheiten Einfluss auf das Ergebnis der Methode. Sie tragen dementsprechend unterschiedlich stark zur Höhe der Sensitivität und Spezifität der TMS allgemein bei. Andererseits können zur Minimierung falsch positiver bzw. falsch negativer Befunde zusätzliche Faktoren bzw. Parameter und Parameterkombinationen (z.B. die Phe/Tyr-Ratio oder der Fisher-Quotient) mitbestimmt werden. Bei richtiger Anwendung der Methode, mit steigenden Erfahrungen und korrekter Interpretation der resultierenden Befunde könnte die TMS nahezu optimale Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität liefern.

3.5 Statistische Analysen

Durchgeführt wurden mehrere statistische Analysen, um die Aussagekraft gemachter Beobachtungen und angestellter Vergleiche zu verbessern. Die verwendeten Daten wurden aus dem Programm Exel 2000 in das Programm SPSS (Statistical Product and Service Solutions von SPSS Inc.) 12.0.1 übertragen. Anschließend wurden mit Hilfe dieses Programs die entsprechenden statistischen Auswertungen durchgeführt. Wegen der geringen Fallzahlen wurde stets eine „exakte“ Berechnung angewandt.

3.5.1 Statistische Analysen bezüglich der PKU-Verdachtsfälle

Zunächst wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests geprüft, ob hinsichtlich der Spezifität und des positiven Vorhersagewertes für $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Fluorometrie und der Tandemmassenspektrometrie besteht. Die Sensitivität wurde nicht überprüft, da sie für beide Verfahren bei 100% lag. Anschließend wurde gezeigt, dass bereits anhand der Höhe der im Erstscreening gewonnenen Werte eine möglichst sichere Einteilung von Patienten in die einzelnen Untergruppen (PKU-Erkrankung, Hyperphenylalaninämie, falsch Positive) vorgenommen werden kann. Zu diesem Zweck wurden die auffälligen Phenylalaninmesswerte von Kindern mit bekanntem Verlauf in drei Gruppen (PKU, HPA, Falsch Positive) eingeteilt und aufgrund der geringen Fallzahl mittels des „exakten“ Kruskal-Wallis-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. In die Gruppen PKU und HPA wurden sowohl die durch Fluorometrie als auch die durch TMS gefundenen

Patienten einbezogen. Da die Werte der Fluorometrie in mg/dl vorlagen, wurden sie mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors (0,0165) den in $\mu\text{mol/l}$ angegebenen Messwerten der Tandemmassenspektrometrie vergleichbar gemacht. In die Gruppe der falsch Positiven gingen nur in der Tandemmassenspektrometrie auffällig gewordene Patienten ein. Danach wurden die einzelnen Gruppen miteinander durch einen „exakten“ Mann-Whitney-Test verglichen. Sowohl der Kruskal-Wallis-Test als auch der Mann-Whitney-Test sind verteilungsunabhängig. Zur Abbildung der Ergebnisse wurde in SPSS ein Box-Plot-Diagramm (Abbildung 10) erstellt. Dabei gibt die Ausdehnung entlang der y-Achse die Streuung der Werte innerhalb einer Gruppe wieder. Große Boxen stehen für eine große Streuung. Die Größe der Boxen ist dagegen nicht von der enthaltenen Menge an Werten abhängig. Durch Betrachtung eines solchen Diagramms werden Gruppenunterschiede erkennbar.

Seit der Einführung der Tandemmassenspektrometrie wird beim Neugeborenen Screening die Phe/Tyr-Ratio ermittelt. Diese Größe soll eine bessere Identifikation und eine möglichst frühe Beurteilung der Schwere der Erkrankung ermöglichen. Die statistischen Tests und die Gruppeneinteilung entsprachen weitgehend der Analyse der Phenylalaninwerte. Allerdings wurde die Gruppe „falsch Positive“ zweigeteilt, zum einen in die Gruppe der Kinder, die bei ansonsten normalem Neugeborenen Screening ausschließlich durch eine erhöhte Phe/Tyr-Ratio auffällig wurden („FP2“), zum anderen in die Gruppe falsch Positiver, die sowohl durch erhöhtes Phenylalanin als auch durch eine erhöhte Phe/Tyr-Ratio auffällig waren („FP1“). Anschließend wurde der „exakte“ Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Da dieser positiv ausfiel, schlossen sich die exakten Mann-Whitney-Tests an. Die ermittelten p-Werte wurden unter Berücksichtigung der Signifikanzschranken für das von Holm-Shaffer modifizierte Holm-Verfahren ausgewertet.

Alle ermittelten Ergebnisse beziehen sich auf das Signifikanzniveau $p < 0,05$. Da die gebildete Gruppe „HPA“ (= Patienten mit Hyperphenylalaninämie) nur drei bestätigte Fälle enthält, ist eine exakte statistische Aussage, bezogen auf diese Gruppe, problematisch. Um eine Tendenz ableiten zu können, wurden die Ergebnisse auf dem Signifikanzniveau $p < 0,1$ überprüft. Die Gruppen bezüglich der Phe/Tyr-Ratio wurden graphisch mit Hilfe eines Box Plot-Diagramms (Abbildung 11) dargestellt.

3.5.2 Statistische Analysen zu den Galaktosämie-Erkrankungen

Da das Screening auf Gesamtgallaktose zunehmend durch die Messung der Gal-1-PUT-Aktivität ersetzt bzw. ergänzt wird, wurde die Korrelation der beiden Screeningparameter überprüft. Insgesamt 21 Fälle von „milder“ Galaktosämie wurden im Beobachtungszeitraum entdeckt, wovon lediglich 14 in die Analyse eingingen. Dies erklärt sich wie folgt:

- 2 Kinder wurden nur mittels Gal-1-PUT-Aktivitätsmessung gescreent
- bei 2 Kindern ist ein Mangel an der UDP-Gal-4-Epimerase an der Störung beteiligt
- für 3 Kinder sind die ermittelten Daten unvollständig

Die Daten der verbliebenen 14 Patienten wurden mit SPSS analysiert. Es lagen die Erstscreeningergebnisse für Gesamtgalaktose, die später bestimmten Werte für Galaktose-1-Phosphat und die Gal-1-PUT-Aktivität sowie die im Recall (Zweitscreening) ermittelten Werte für Gesamtgalaktose vor. Alle diese Größen wurden miteinander unter Anwendung der Analysefunktion „bivariate Korrelation“ im Programm SPSS 12.0.1 mit Hilfe der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman verglichen. Die ermittelte Korrelation zwischen dem Gesamtgalaktosewert im Erstscreening und der ermittelten Gal-1-PUT-Aktivität wurde graphisch durch eine Punktwolke dargestellt (Abbildung 12).

3.5.3 Analyse der MCAD-Mangel Patienten

Patienten, die mehrfach für den MCAD-Mangel auffällig waren bzw. nachweislich unter einer Form von MCAD-Mangel leiden, wurden hinsichtlich der Höhe des Screeningparameters C8 mit Patienten verglichen, die im Neugeborenen Screening auffällig waren und sich als falsch Positive herausstellten. Die Analyse fand in SPSS 12.0.1 mit Hilfe des exakten Mann-Whitney-Tests statt. Es sollte gezeigt werden, ob ein Unterschied hinsichtlich der Höhe von C8 zwischen den beiden Gruppen besteht. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Box-Plot-Diagramms (Abbildung 15) dargestellt.

3.5.4 Statistische Analyse zu den Tyrosinämieverdachtsfällen

Die Tyrosinämie ist eine der Erkrankungen, die durch die Tandemmassenspektrometrie erkannt wird. Besonders deutlich zeigt sich bei diesem Parameter das Problem, dass Frühgeborene überdurchschnittlich oft im Neugeborenen Screening auffällig werden. Für die überwiegende Anzahl von Tyrosinämieverdachtsfällen konnte aus den Screeningprotokollen, den Akten behandelter Kinder und den Daten, die dem Screeningzentrum in Erfurt zur Verfügung stehen, die Schwangerschaftswoche der Mutter bei der Geburt ermittelt werden. Insgesamt handelt es sich um 23 Verdachtsfälle, die in drei Gruppen (sehr frühe Frühgeborene („SFG“), Frühgeborene („FG“), Reifgeborene („RG“)) eingeteilt wurden. In SPSS 12.0.1, erfolgte eine Analyse der Höhe der Tyrosinwerte in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Um diese Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Anschließend wurden alle drei Gruppen untereinander durch den Mann-Whitney-Test verglichen. Alle statistischen Tests wurden wegen der geringen Fallzahlen exakt berechnet. Die Ergebnisse wurden durch ein Box-Plot-Diagramm (Abbildung 20) dargestellt.

4. Ergebnisse

Voraussetzung für die Durchführung der Untersuchung zum Thüringer Neugeborenencreening war die Erhebung grundlegender Daten, die einen Überblick ermöglichen. Dabei wurde die Anzahl an Lebendgeburten und die Anzahl der mittels Neugeborenencreening untersuchten Kinder festgestellt. Zusätzlich wurde für die Jahre 1997 bis 2003 die Anzahl der positiven Erstscreeningsbefunde ermittelt. Die Anzahl positiver Erstscreenings entspricht der Anzahl der durchgeführten Recalls. Die Anzahl der Recalls, bezogen auf die Anzahl der durchgeführten Screenings, entspricht der „Recallrate“. In Tabelle 2 wird ein Überblick über diese Informationen gegeben.

Für die Jahre 1997 bis 2001 betrug die Recallrate durchschnittlich 0,47%. Nach Einführung der TMS waren es 1,17%. Der positive Vorhersagewert fiel von 9,6% auf 7,65%. Das PKU-Screening wurde, mit dem November 2001 beginnend, mit Hilfe der TMS durchgeführt. Wenn betrachtet werden soll, inwieweit die TMS zur Erhöhung der Recallrate beigetragen hat, muss der Anteil der PKU- bzw. HPA- Verdachtsfälle an der Recallrate subtrahiert werden. Daher werden die nach dem 01.11.2001 für PKU bzw. HPA Auffälligen sowohl in Tabelle 3 als auch in Abbildung 7 gesondert dargestellt.

Tabelle 2: Bezugsdaten der Jahre 1997-2003

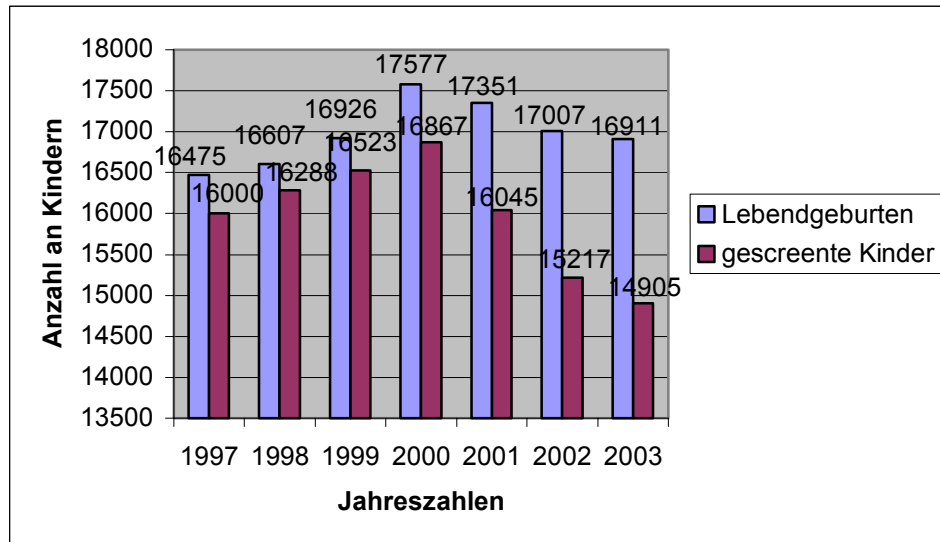
| Jahr | Lebendgeborene | Gescreente Kinder | Positive Erstscreenings | Recallrate |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
| 1997 | 16475 | 16000 | 50 | 0,3125 |
| 1998 | 16607 | 16288 | 77 | 0,4727 |
| 1999 | 16926 | 16523 | 114 | 0,6899 |
| 2000 | 17577 | 16867 | 96 | 0,5691 |
| 2001 | 17351 | 16045 | 68 | 0,4238 |
| 01.11.2001- 31.12.2003 | 2931 | 2386 | 30(inkl. TMS*) | 1,2573 |
| 2002 | 17007 | 15217 | 145 | 0,9528 |
| 2003 | 16911 | 14905 | 204 | 1,3687 |
| Gesamt: | 118854 | 111845 | 762 | |
| TMS(2001) | 2931 | 2386 | 25 | 1,0478 |
| TMS(2002) | 17007 | 15217 | 124 | 0,8148 |
| TMS(2003) | 16911 | 14905 | 156 | 1,0466 |

*TMS = Tandemmassenspektrometrie; „Lebendgeburten“ = Anzahl an Kindern, die in Thüringen hätten untersucht werden sollen, „Gescreente Kinder“ = Anzahl an Kindern, die tatsächlich untersucht wurden. Die in den jeweiligen Jahren mittels TMS untersuchten Kinder werden extra dargestellt, um den Anteil der TMS an den Testpositiven zu zeigen, wobei auch die PKU bzw. HPA-Verdachtsfälle in die Recallrate durch TMS eingingen.

Die Abbildung 6 stellt den Anteil der gescreenten Kinder an der Population der Lebendgeborenen dar. Man erkennt eine zunehmende Differenz zwischen den

Lebendgeburten und der Anzahl an Screenings. Im Jahre 1998 wurden 98,08% der Lebendgeborenen im Thüringer Neugeborenen Screening erfasst, 2000 waren es 95,96% und im Jahre 2003 nur noch 88,14%.

Abbildung 6: Verhältnis von Geburten zu Screenings



Dargestellt wird die Differenz zwischen der Anzahl der in Thüringen geborenen Kinder und der Anzahl der durch das Screeningzentrum in Erfurt erfassten Kinder auf. Diese Differenz ist von 2000 an, bis einschließlich 2003 im Steigen begriffen.

4.1 Resultate der einzelnen Labormethoden

In Tabelle 3 sind die auffälligen Screeningbefunde in den entsprechenden Jahren, unterteilt nach Erstscreenings, Recalls und bestätigten Fällen, dargestellt. Daraus geht hervor, wie sich die positiven Befunde auf die konventionellen Testverfahren (Fluorometrie zum Screening auf PKU, Galaktosämiescreening, Biotinidascreening) und die TMS verteilen. Man erkennt, wie sich die Ergebnisse für die PKU vor und nach der Umstellung 2001 verhielten. Das Jahr 2001 erscheint bedingt durch die Screeningumstellung zweigeteilt.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, gab es im Jahr 2002 zwölf bestätigte Diagnosen (Häufigkeit 1:1268), wovon elf auf die Tandemmassenspektrometrie zurückgingen. Im Jahr 2003 wurden 14 Diagnosen bestätigt (Häufigkeit 1:064), wovon neun auf der Tandemmassenspektrometrie beruhten.

Tabelle 3: Auffällige und bestätigte Screeningfälle von 1997-2001

| Jahr | Erkrankung | Positive Erstscreenings | Positive Recalls | Bestätigte Fälle |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------|
| 1997 gesamt | | 50 | 5 | 5 |
| | PKU/HPA | 7 | 5 | 5* |
| | Galaktosämie | 24 | Keine | keine |
| | Biotinidase | 19 | Keine | keine |
| 1998 gesamt | | 77 | 6 | 6 |
| | PKU/HPA | 21 | 4 | 4 |
| | Galaktosämie | 16 | 1 | 1* |
| | Biotinidase | 40 | 1 | 1 |
| 1999 gesamt | | 114 | 14 | 14 |
| | PKU/HPA | 21 | 2 | 2 |
| | Galaktosämie | 37 | 10 | 10* |
| | Biotinidase | 56 | 2 | 2 |
| 2000 gesamt | | 96 | 5 | 5 |
| | PKU/HPA | 27 | 3 | 2+1 x Tyrosinämie |
| | Galaktosämie | 45 | 1 | 1* |
| | Biotinidase | 24 | 1 | 1 |
| 2001 gesamt | | 68 | 16 | 9 |
| | PKU/HPA (Jan-Okt) | 15 | 2 | 2 |
| | Galaktosämie (Jan-Okt) | 12 | 3 | 3* |
| | Biotinidase (Jan-Okt) | 11 | 1 | 1 |
| | PKU/HPA (Nov-Dez) | 4° | Keine | keine |
| | Galaktosämie(Nov-Dez) | 3 | Keine | keine |
| | Biotinidase (Nov-Dez) | 2 | Keine | keine |
| | TMS (Nov-Dez) | 25 | 10 | 3 + 6 x sek.Carnitinmangel |
| 2002 gesamt | | 145 | 26 | 12 |
| | PKU/HPA | 28 | 9 | 6 |
| | Galaktosämie | 5 | Keine | keine |
| | Biotinidase | 16 | 1 | 1 |
| | TMS | 124 | 25 | 11+ 7 x sek.Carnitinmangel |
| 2003 gesamt | | 204 | 32 | 14 |
| | PKU/HPA | 9 | 5 | 3 |
| | Galaktosämie (Gesamtgalaktose) | 15 | 2 | 2* |
| | Galaktosämie (Gal-1-PUT) | 13 | 2 | 2* |
| | Biotinidase | 20 | 1 | 1 |
| | TMS | 156 | 27 | 9 |

Ergebnisse des Thüringer Neugeborenencreenings zwischen dem 01.01.1997 und dem 31.12.2003, unterteilt nach den angewendeten Labormethoden. Seit dem 01.11.2001 wird das erweiterte NGS eingesetzt. Von da an wurde auch das PKU-Screening mittels TMS durchgeführt. Die grauen Werte stellen den Anteil an PKU- bzw. HPA-Verdachtsfällen unter den durch TMS Auffälligen dar. Am 10.09.2003 wurde die Bestimmung der Gesamtgalaktosemenge im Blut durch die Messung der Gal-1-PUT-Aktivität ersetzt. Daher erscheinen 2003 zwei Spalten für die Resultate des Galaktosämiescreenings. Gal-1-PUT = Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase

* Alle Fälle von Galaktosämie, die bestätigt werden konnten, sind milde Varianten und keine klassischen Galaktosämien die auf zwei schweren Mutationen im Gal-1-PUT-Gen beruhen.

° Das Screening auf PKU und HPA fand im November und Dezember 2001 mittels TMS statt.

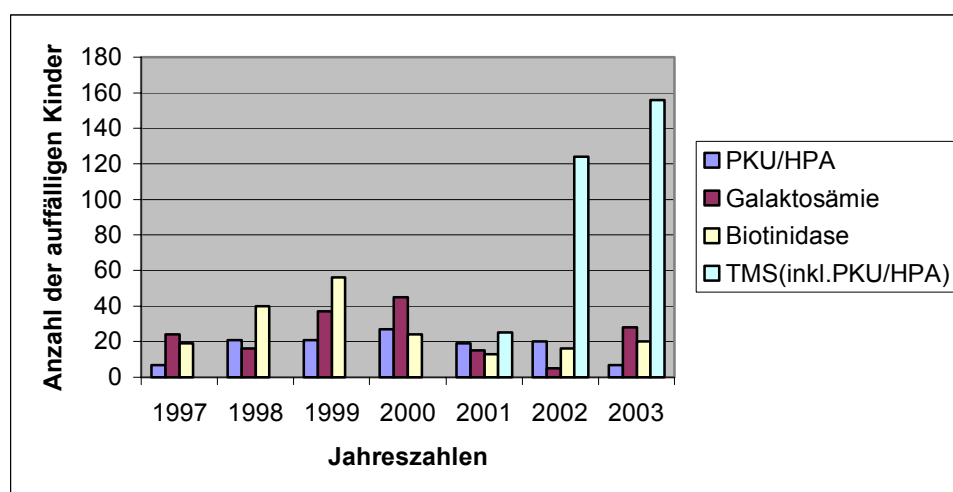
Die Diagramme in den Abbildungen 7, 8 und 9 stellen graphisch die Ergebnisse von Tabelle 3 dar. Abbildung 7 zeigt die Anzahl positiver Erstscreeningbefunde (= notwendige Recalls) in Abhängigkeit von der angewandten Labormethode. In Abbildung 8 werden die aus dem Neugeborenencreening resultierenden, auffälligen Erstscreeningbefunde in komprimierter Form dargestellt. Von 1997-2001 beinhaltet dies die Anzahl der notwendigen Recalls durch PKU-, Galaktosämie- und Biotinidascreening. Ab November 2001 gingen die durch TMS auffälligen Befunde in das Recall ein.

Für die Galaktosämie fand im September 2003 die Umstellung des Screenings von der Bestimmung der Gesamtgalaktose auf die Gal-1-PUT-Messung statt. Das Screening auf Biotinidasemangel wurde im gesamten Zeitraum mittels desselben Verfahrens durchgeführt.

Wie sich die Recallraten und positiven Vorhersagewerte der konventionellen Screeningverfahren entsprechend der angewandten Screeningmethode verhalten haben, zeigt Tabelle 4.

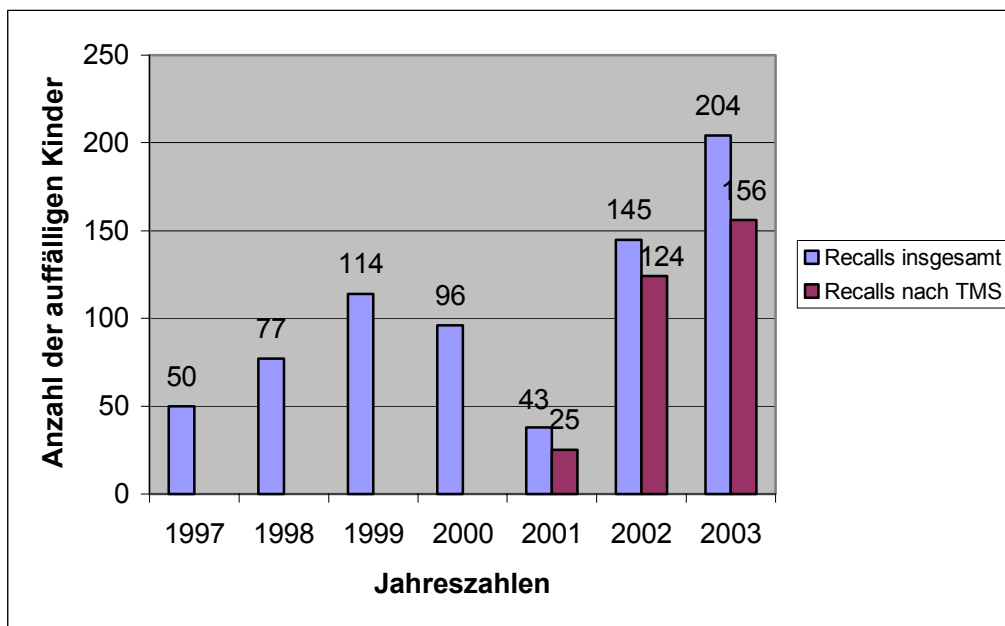
Die durchgeführten Recalls erbrachten positive Befunde, aus denen sich die endgültigen Diagnosen ergeben haben. Dabei ließ sich beobachten, dass vor Einführung der TMS die Anzahl der positiven Recalls genau der Anzahl bestätigter Fälle entsprach. Nach Einführung der TMS überwog die Anzahl positiver Recalls die Anzahl bestätigter Fälle. In Abbildung 9 ist diese Entwicklung dargestellt, in dem das Verhältnis pos. Recalls/best. Fälle gebildet wurde.

Abbildung 7: Anzahl auffälliger Erstscreenings nach Erkrankung bzw. Art des Tests



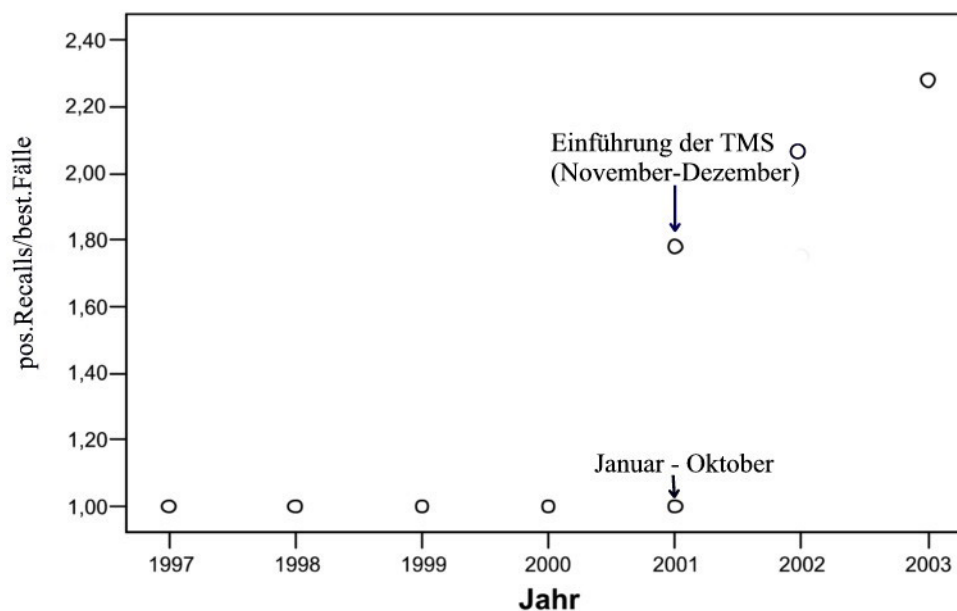
Die TMS wurde ab 01.11.2001 durchgeführt und ist mit diesem Jahre beginnend in der Abbildung dargestellt. Die Fluorometrie zum Screening auf PKU wurde nur bis zum 31.10.2001 eingesetzt, ab dem 01.11.2001 ging das PKU-Screening in die TMS ein. Die PKU wird extra dargestellt um ihren Anteil an den durch TMS Auffälligen zu zeigen. Für 2003 beinhaltet die Säule für Galaktosämie, sowohl die durch Gesamtgalaktosemessung auffälligen Befunde als auch die auffälligen Ergebnisse nach Gal-1-PUT-Aktivitätsmessung.

Abbildung 8: Anzahl der Recalls in den entsprechenden Jahren



Die Abbildung zeigt die Anzahl der Recalls in den untersuchten Jahren. Die roten Säulen stellen den Anteil der blauen Säulen dar, der auf TMS beruht. Die blauen Säulen beinhalten die Auffälligen für PKU, Galaktosämie, Biotinidasemangel und TMS. Die roten Säulen beinhalten alle Auffälligen durch TMS, inklusive der PKU- bzw. HPA-Verdachtsfälle.

Abbildung 9: Verhältnis positiver Recalls zu bestätigten Diagnosen



Verhältnis zwischen positiven Recalls (Zweitscreenings) und bestätigten Fällen. Bis zur Einführung der TMS entsprachen sich diese beiden Werte ($\text{pos. Recalls} / \text{best. Fälle} = 1$). Ab November 2001 gab es stets mehr positive Recalls als bestätigte Fälle ($\text{pos. Recalls} / \text{best. Fälle} > 1$).

Tabelle 4: Bezugsdaten der konventionellen Screeningverfahren

| Erkrankung | Auffällige | Recallrate in % | Falsch Positive | Positiver Vorhersagewert | n = Anzahl der untersuchten Kinder |
|--------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|---|
| PKU/HPA-Screening durch Fluorometrie | 91 | 0,11 | 75 | 18% | 79.337 |
| Galaktosämie durch Gesamtgallaktose | 157 | 0,15 | 140 | 11% | 107.516 |
| Galaktosämie durch Gal-1-PUT Messung | 13 | 0,3 | 11 | 15% | 4.329 |
| Biotinidase | 188 | 0,17 | 182 | 3% | 111.845 |

N = 111.845 (Anzahl der von 1997 bis 2003 insgesamt Untersuchten) Die Fluorometrie wurde im relevanten Zeitraum zwischen dem 01.01.1997 und dem 31.10.2001 eingesetzt. Das Screening auf Galaktosämie wurde zwischen dem 01.01.1997 und dem 10.09.2003 mittels Untersuchung der Gesamtgallaktose und ab 11.09.2003 bis zum 31.12.2003 durch Messung der Gal-1-PUT-Aktivität durchgeführt.

4.2 Veränderungen beim PKU-Screening

Im Folgenden werden die Veränderungen betrachtet, die sich durch die Einführung der Tandemmassenspektrometrie ergeben haben. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Tandemmassenspektrometrie bei einer vergleichbaren oder sogar geringfügig höheren Sensitivität im Vergleich zur zuvor verwendeten Fluorometrie eine deutlich bessere Spezifität und einen höheren positiven Vorhersagewert aufweist.

4.2.1 Vergleich zwischen Ergebnissen der Fluorometrie und der TMS

Vom 01.01.1997 bis 31.10.2001 wurden 79337 Kinder mittels Fluorometrie auf PKU bzw. HPA untersucht (Tabelle 4 und 5).

Zwischen dem 01.11.2001 und dem 31.12.2003 wurden insgesamt 32508 Kinder untersucht. Tabelle 5 stellt, basierend auf Recallraten und positiven Vorhersagewerten, einen Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Testverfahren in Thüringen an.

Tabelle 5: Vergleich der Labormethoden zum PKU-Screening

| Vergleichsparameter | Eckdaten der Fluorometrie | Eckdaten der TMS |
|---------------------------------|---------------------------|------------------|
| Untersuchte Kinder | 79337 | 32508 |
| Auffällige Erstscreeningbefunde | 91 | 41 |
| Recallrate insgesamt | 0,11% | 0,13% |
| 2002 | | 0,18% |
| 2003 | | 0,06% |
| Auffällige Zweitscreenings | 16 | 14 |
| Bestätigte Diagnosen | 15 | 9 |
| PKU | 10 | 6 |
| HPA | 5 | 3 |
| Positiver Vorhersagewert | 17% | 22% |
| 2002 | | 21% |
| 2003 | | 66% |

Vergleich der grundlegenden Daten des PKU(HPA)-Screenings mittels Fluorometrie (Januar1997-Oktober 2001) und TMS (November 2001- Dezember 2003).

Die dargestellten Ergebnisse spiegeln sich bei Anwendung des „exakten“ Chi-Quadrat-Tests wieder. Die beiden Untersuchungsverfahren zeigen hinsichtlich der ermittelten Spezifität keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,916$). Auch hinsichtlich des positiven Vorhersagewertes konnte mit $p = 0,471$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsmethoden ermittelt werden.

Die Verdachtsdiagnose PKU bzw. HPA wurde auch dann gestellt, wenn Kinder in der TMS (ohne gleichzeitige Phenylalaninerhöhung) für die Phe/Tyr-Ratio auffällig waren. Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchungsmethoden unter der Voraussetzung, dass in der Tandemmassenspektrometrie nur Kinder mit erhöhtem Phenylalanin als Testpositive gelten, ergibt sich für die Spezifität $p = 0,001$ und für den positiven Vorhersagewert $p = 0,016$. Unter dieser Voraussetzung besteht also ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Untersuchungsverfahren.

4.2.2 Vergleich der Screeningparameter, die auf eine PKU oder HPA hindeuten

Die Tandemmassenspektrometrie findet außer der Aminosäure Phenylalanin weitere Hinweisfaktoren, die auf die PKU bzw. HPA hindeuten können. Ein Screeningparameter, der bei der Diagnostik der PKU bzw. HPA verwendet wird, ist die Phe/Tyr-Ratio. Wie viele Kinder für Phenylalanin und/oder die Phe/Tyr-Ratio bzw. ausschließlich für die Phe/Tyr-Ratio auffällig waren, zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Vergleich der Screeningparameter Phenylalanin und Phe/Tyr-Ratio

| Screeningparameter | Phenylalanin | Phe/Tyr-Ratio |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------|
| Cut-Off-Wert | 150µmol/l | 2,00 |
| Auffällige im Erstscreening insgesamt | 17 | 20 |
| Auffällige 2002 | 12 | 16 |
| Auffällige 2003 | 5 | 4 |
| Recallrate | 0,056% | 0,066% |
| Positiver Vorhersagewert | 53% | 0% |

Dargestellt sind Kinder, die in den Jahren 2002 und 2003 für PKU bzw. HPA auffällig waren. Die Kinder die ein erhöhtes Phenylalanin aufwiesen, zeigten zum Teil auch Erhöhungen der Phe/Tyr-Ratio. Die Kinder, die in der Spalte erhöhte Phe/Tyr-Ratio aufgeführt sind, waren für keinen weiteren Screeningparameter auffällig, der auf PKU bzw. HPA hindeuten würde.

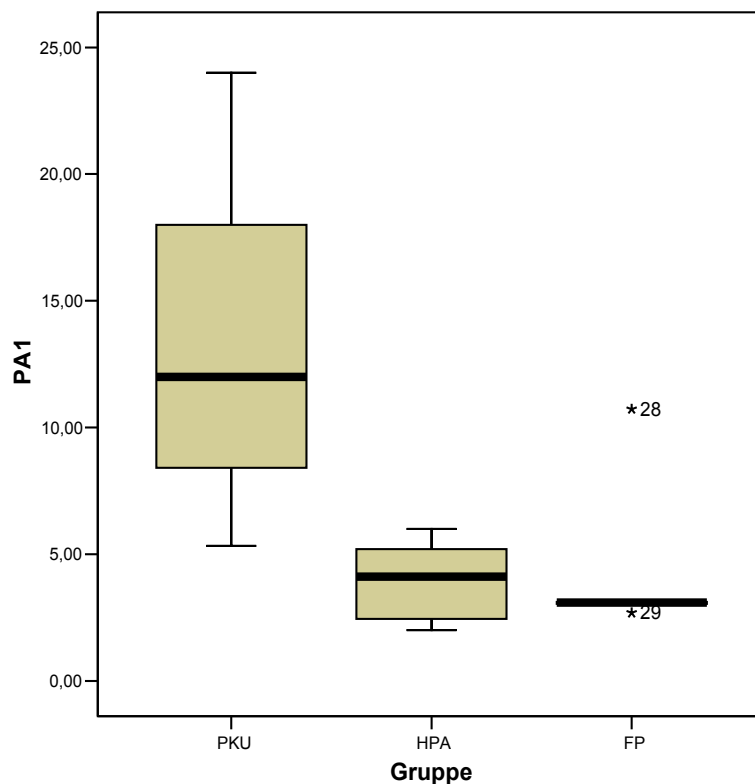
4.2.3 Höhe der Erstscreeningwerte und resultierende Verdachtsdiagnose

Zum Screening auf PKU bzw. HPA dient die Aminosäure Phenylalanin. Seit Einführung der TMS liefert auch die Phe/Tyr-Ratio Informationen. Dabei ist nicht nur die Frage entscheidend, ob ein Screeningparameter erhöht ist, sondern auch die Frage, wie stark er erhöht ist. Inwieweit die Höhe des Phenylalanins bzw. der Phe/Tyr-Ratio in Thüringen mit der Schwere der Erkrankung in Zusammenhang stand, wird in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

Zunächst wird die Aminosäure Phenylalanin unter diesem Aspekt betrachtet. Zu diesem Zweck wurden die für Phenylalanin Auffälligen in drei Gruppen eingeteilt, die an „PKU“ Erkrankten, die an „HPA“ Erkrankten und die falsch Positiven (FP).

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den in Abbildung 10 dargestellten Gruppen nachweisen ($p < 0,001$). Darauf basierend kann mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests gezeigt werden, dass sowohl zwischen den Gruppen PKU und HPA als auch zwischen den Gruppen „PKU“ und „FP“ ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ besteht. Zwischen der Gruppe „HPA“ und der Gruppe „falsch Positive“ besteht kein signifikanter Unterschied.

Abbildung 10: Gruppenvergleich PKU, HPA und falsch Positive



PKU:
 N = 16
 Mittelwert = 13,30 mg/dl
 Untere Grenze: 10,09 mg/dl
 Obere Grenze: 16,51 mg/dl
 Median = 12,00 mg/dl

HPA:
 N = 8
 Mittelwert = 3,94 mg/dl
 Untere Grenze: 2,62 mg/dl
 Obere Grenze: 5,26 mg/dl
 Median = 4,11 mg/dl

Falsch Positiv:
 N = 7
 Mittelwert = 4,11 mg/dl
 Untere Grenze: 1,42 mg/dl
 Obere Grenze: 6,82 mg/dl
 Median = 3,09 mg/dl

Die Abbildung zeigt, dass bei Kindern mit der Diagnose PKU bereits bei den Erstscreeningswerten signifikant höhere Phenylalaninwerte auftraten, als bei den Kindern mit HPA oder bei den falsch Positiven. Der Ausreißerwert (28) in der Gruppe der falsch Positiven gehört zu dem Kind einer an PKU erkrankten Mutter.

Um bereits beim Erstscreening eine Unterscheidung zwischen einer behandlungsbedürftigen Erkrankung und einer nicht behandlungsbedürftigen Form treffen zu können, benötigt man weitere Anhaltspunkte. Als ein solcher kann seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie die Phe/Tyr-Ratio dienen. Es wurden wiederum Gruppen gebildet, wobei die Gruppe der falsch Positiven zweigeteilt wurde.

Das Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests zeigt, dass zwischen den Gruppen PKU, HPA, FP1 und FP2 ein deutlicher signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) besteht. FP1 steht dabei für die Gruppe falsch positiver Kinder, die in erster Linie durch einen erhöhten Phenylalaninwert auffällig wurden. Das Verhältnis von Phenylalanin zu Tyrosin lag in dieser Gruppe in Einzelfällen unter dem Cut-Off-Wert von 2.

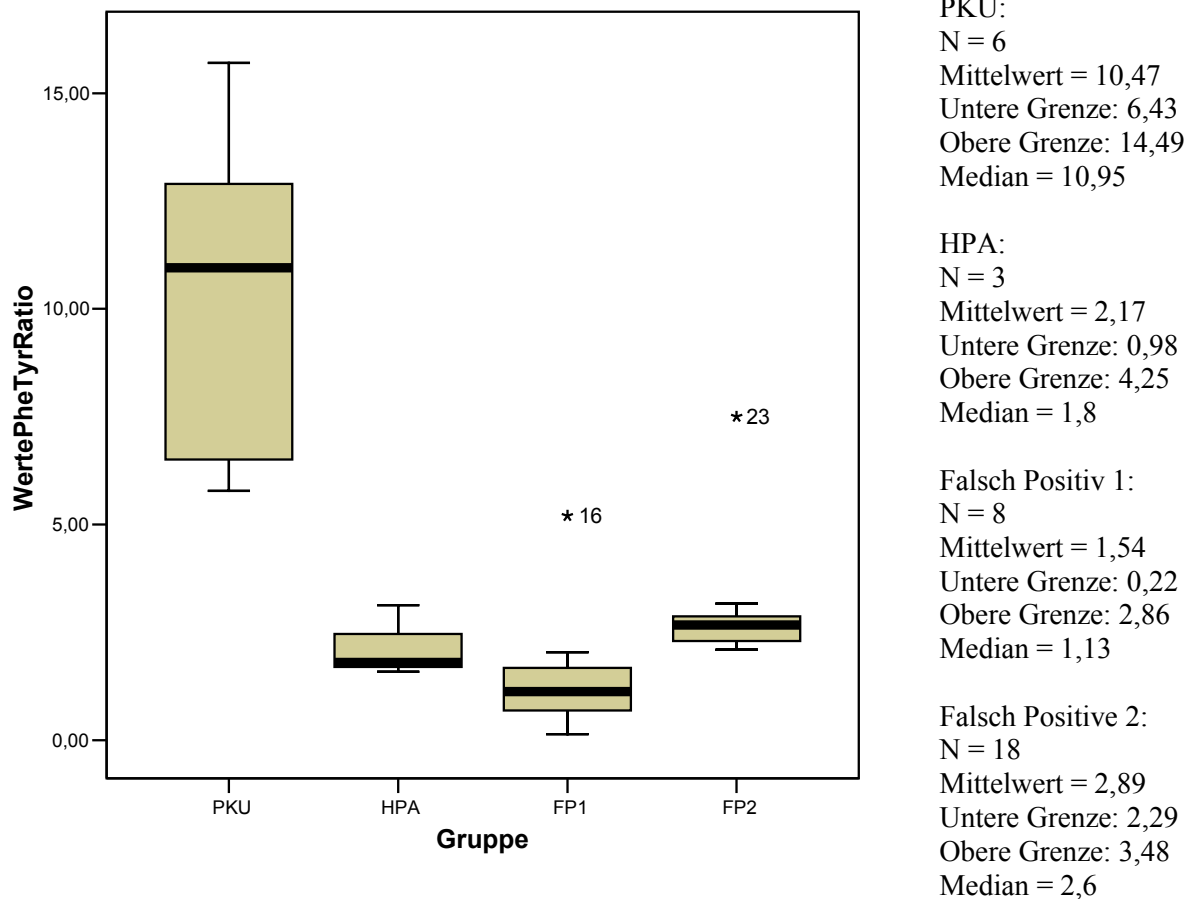
In der Gruppe FP2 sind die Kinder erfasst, die ausschließlich durch ein erhöhtes Verhältnis von Phenylalanin zu Tyrosin auffällig wurden. Im Mittel wurde für die Gruppe FP2 ein Wert von 2,89 ermittelt. Die Verteilung der Werte ist graphisch im Boxplot-Diagramm (Abbildung 11) dargestellt. Die anschließend an den Kruskal-Wallis-Test durchgeführten Mann-Whitney-Tests zeigten, dass sowohl zwischen den Gruppen PKU und FP1 ($p < 0,01$) als auch zwischen

den Gruppen PKU und FP2 ($p < 0,01$) ein signifikanter Unterschied besteht. Auch die Gruppen FP1 und FP2 ($p < 0,001$) unterscheiden sich signifikant.

Im Falle einer bestätigten PKU lagen die Werte für die Phe/Tyr-Ratio im Mittel bei 10,47 und niemals unter dem Wert von 5,5.

Zwischen den Gruppen PKU und HPA ($p = 0,024$) ließ sich gemäß der bestehenden Signifikanzschranken auf dem 5%-Signifikanzniveau kein Unterschied nachweisen. Zwischen den Gruppen HPA und FP1 sowie zwischen den Gruppen HPA und FP2 besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Abbildung 11: Höhe des Phe/Tyr-Quotienten bei PKU, HPA und falsch Positiven



Die Gruppen PKU und FP1, PKU und FP2 sowie FP1 und FP2 unterscheiden sich signifikant. Zwischen den übrigen Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Der Ausreißerwert (16) in Gruppe FP1 ist durch eine an PKU erkrankte Mutter, der Ausreißer (23) in Gruppe FP2 durch die Frühgeburtlichkeit des Kindes (35. SSW) bedingt.

4.3 Ergebnisse für Galaktosämie und Biotinidase

4.3.1 Galaktosämie

Zwischen 1997 und 2003 wurden 170 Kinder für die Galaktosämie auffällig. Davon 157 bis zum 10.11.2003 durch erhöhte Gesamtgalaktosewerte und 13 in den letzten 4 Monaten 2003 durch erniedrigte Gal-1-PUT-Aktivität. Für das Screening auf Gesamtgalaktose ergab sich damit eine Recallrate von 0,15% (Tabelle 4). Für das Screening auf die Gal-1-PUT-Aktivität lag die Recallrate bei 0,3% (Tabelle 4). Dieser Wert bezieht sich ausschließlich auf den kurzen Zeitraum zwischen dem 11.09.2003 und dem 31.12.2003.

Die Sensitivität lag für das Screening mittels Gesamtgalaktosemessung bei 89% und bei 100% für das Screening auf die Gal-1-PUT-Aktivität, da hier keine falsch negativen Ergebnisse bekannt sind. Die Spezifität des Screenings auf Gesamtgalaktose betrug 99,87%, die des Screenings mittels Messung der Gal-1-PUT-Aktivität 99,75%.

Innerhalb von sieben Jahren wurden 21 Fälle von milder Galaktosämie diagnostiziert und sind in Tabelle 7 dem Genotyp entsprechend dargestellt. In neun der 21 gefundenen Fälle handelt es sich um compound-heterozygote Kombinationen der Duarte-Variante mit einer Mutation für klassische Galaktosämie (G). In vier weiteren Fällen liegt die Duarte-Variante homozygot vor. Vier der auffälligen Kinder sind als heterozygot für das Galaktosämiegen eingestuft worden. Bei einem Kind lag ein Epimerasemangel vor. Ein weiteres Kind wurde durch einen angeborenen beidseitigen Katarakt auffällig, nachdem das Neugeborenencreening 1999 unauffällig ausgefallen war. Speziell bei diesem Kind legen die Testergebnisse der Eltern nahe, dass eine Kombination des Epimerasemangels mit dem Gen für die klassische Galaktosämie vorliegt. Zwei der im Screening auffälligen Kinder sind als transitorische Fälle von Galaktosämie einzustufen.

Betrachtet man die Allelhäufigkeit der Duarte2-Mutation (D2) und der Mutation für die klassische Galaktosämie (G), so zeigt sich, dass im betrachteten Kollektiv die D2-Mutation häufiger auftritt als die Mutation G. Insgesamt 14mal liegt die Mutation G vor, während die Mutation D2 17mal gefunden wurde. Für D2 liegen vier als homozygot eingestufte Fälle vor. Es ist feststellen, dass die Zuordnung des Genotyps für die Galaktosämie nur bei einigen Patienten mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte. Für die anderen beruht die Zuordnung des Genotyps auf wiederholten Bestimmungen von Gesamtgalaktose, Galaktose-1-Phosphat, Messungen der Gal-1-PUT-Aktivität sowie dem Vergleich mit den Referenzwerten für den jeweiligen Genotyp. Dies trifft unter anderem auf das Kind zu, das 1998 klinisch auffällig wurde. Seine Werte lagen im Bereich für eine homozygote Duarte-Variante.

Tabelle 7: Genotypen der gefundenen Galaktosämien

| Erkrankung/Typ | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 |
|-----------------------------|------|-------|------|------|------|------|------|
| D2/G | | | 6 | | 1 | | 2 |
| D2/D2 | | 1,(1) | | | | | 2 |
| N/G | | | 3 | | 1 | | |
| Epimerasemangel | | | 1 | | | | |
| Epimerasemangel/G | | | | | | (1) | |
| Transitorische Galaktosämie | | | 1 | | 1 | | |

Verteilung der verschiedenen Formen bzw. Schweregrade der Galaktosämie, die in Thüringen auftraten. Die in Klammern stehenden Fälle wurden klinisch im Rahmen der Abklärung eines juvenilen Kataraktes auffällig. Abkürzungen: D2 = Duarte 2 Variante, G = Mutation für klassische Galaktosämie, N = normales Allel

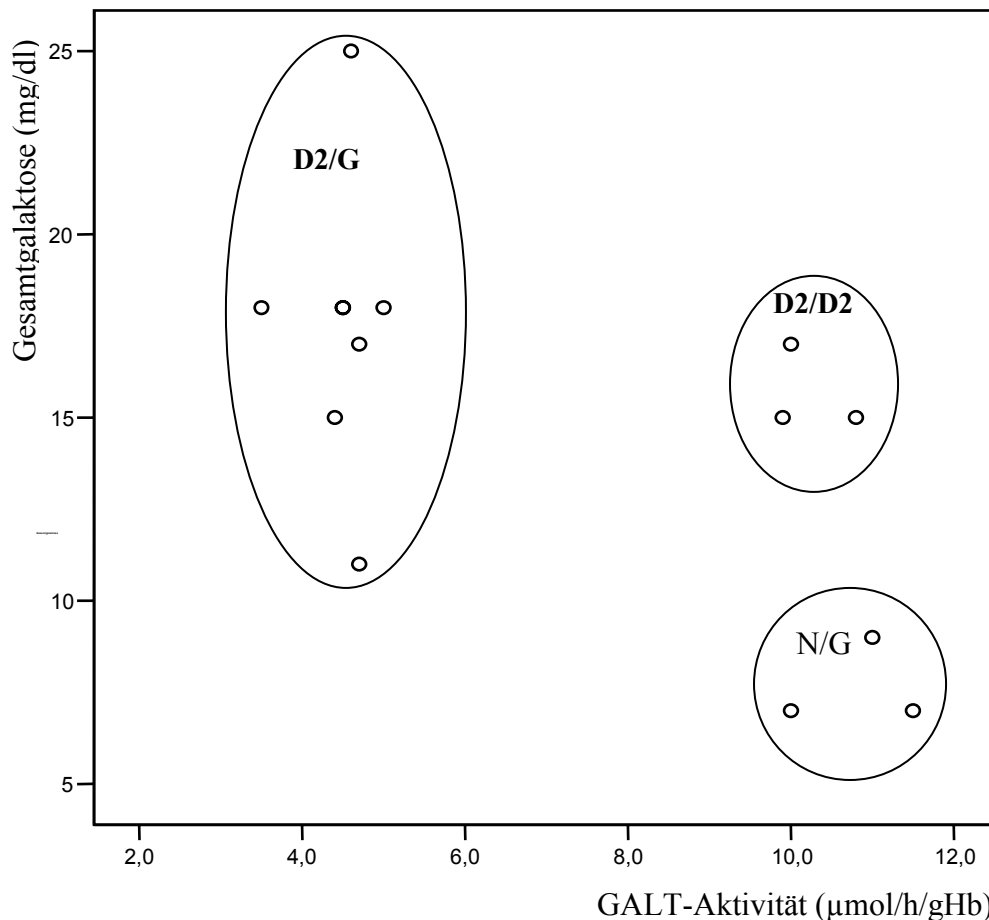
4.3.2 Gegenüberstellung von Gesamtgalaktose-Bestimmung und Gal-1-PUT-Messung

Im Rahmen der Bestätigungsdiagnostik für die zwischen 01.01.1997 und 31.10.2003 auffälligen Befunde wurde stets auch die Gal-1-PUT-Aktivität (GALT-Aktivität) bestimmt. Wenn man die Werte für Gesamtgalaktose aus dem Erstscreening (vor jeder Nahrungsumstellung) mit den Werten der Gal-1-PUT-Aktivität korreliert, zeigt sich für diese Wertepaarung ein negativ korrelierter signifikanter Zusammenhang. Dies untermauert, dass die Menge an Gesamtgalaktose bei geringer Gal-1-PUT-Aktivität größer ist. Bewiesen wird diese Behauptung durch die Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson ($p=0,631$) und Spearman ($p=0,670$) sowie durch eine signifikante Regressionsanalyse.

Abbildung 9 stellt anhand einer Punktwolke die Verteilung von 14 Wertepaaren dar und verdeutlicht den Zusammenhang zwischen den gemessenen Werten für Gesamtgalaktose und der Gal-1-PUT-Aktivität. Die Kinder, die nach der Screeningumstellung im Jahre 2003 auffällig wurden (Tabelle 7), konnten auf Grund mangelnder Daten nicht weiterverfolgt werden.

Bei den im linken oberen Quadranten angesiedelten Fällen handelt es sich ausschließlich um Kinder, die compound-heterozygot für die Mutationen G (klassische Galaktosämie) und D2 (Duarte-Variante) waren. Diese Kinder wiesen die geringste Aktivität des Enzyms Gal-1-PUT und die höchste Substratkonzentration (Gesamtgalaktose) auf. Im rechten unteren Quadranten sind die Kinder angesiedelt, die heterozygot für die Mutation G waren bzw. homozygot für die Duarte Variante. Der Normal-Genotyp wird mit N bezeichnet.

Abbildung 12: Korrelation zwischen Gesamtgalaktose und der Gal-1-PUT-Aktivität



Verteilung von 14 Wertepaaren, die die Aktivität des Enzyms Gal-1-PUT (GALT) und die Menge an Gesamtgalaktose im Blut repräsentieren. Man erkennt 13 Punkte, da zwei Wertepaare komplett identisch sind. Statistisch ergibt sich für die dargestellten Wertepaare ein negativ korrelierter signifikanter Zusammenhang. Die zu erkennende Zweiteilung erklärt sich daraus, dass sich die Werte der compound-heterozygoten Kinder (Genotyp D2/G) im linken oberen Anteil der Punktwolke befinden, während die Werte der Kinder mit einer homozygoten Duarte-Variante (Genotyp D2/D2) bzw. die der für Galaktosämie heterozygoten (Genotyp N/G) Kinder rechts unten verteilt sind.

4.3.3 Biotinidase

Insgesamt sechs Fälle von partiellem Biotinidasemangel wurden in Thüringen zwischen 1997 und 2003 bestätigt (Tabelle 8). Diese gingen hervor aus 188 positiven Erstscreenings, das entspricht einem positiven Vorhersagewert von 3%. Ein kompletter Biotinidasemangel mit Enzymaktivität < 10% fand sich nicht. Fälle zwischen 10% und 15% Restaktivität werden mit „stark verminderter Biotinidaseaktivität“ charakterisiert. Die Recallrate, bezogen auf alle für diese Erkrankung im vorgegebenen Zeitraum gescreenten Kinder, betrug 0,17% (Tabelle 4). Die Ergebnisse des Recalls wiederum entsprechen genau den letztlich bestätigten Fällen. Der positive Vorhersagewert des Recalls kann also mit 100% angegeben werden. Da keine falsch

negativen Ergebnisse bekannt sind, betrug die Sensitivität der Methode 1, die Spezifität lag bei 0,998.

In fünf der sechs Fälle von partiellem Biotinidasemangel lag bereits der Erstscreeningwert im Bereich für eine milde Variante, also im Bereich zwischen 15 und 35% Restaktivität, was als „verminderte Biotinidaseaktivität“ eingestuft wird. Ein Fall verpasste mit 14% Aktivität nur knapp diese Gruppe und wurde nach dem Erstscreening als Patient mit „stark verminderter Biotinidaseaktivität“ eingestuft. Auch für dieses Kind erbrachten die folgenden Untersuchungen und Messungen der Biotinidaseaktivität das Ergebnis, dass nur eine mildere und keine komplette Störung vorliegt.

Tabelle 8: Häufigkeit des Biotinidasemangels

| Erkrankung | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Biotinidasemangel | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Die Tabelle zeigt, dass in jedem Jahre des untersuchten Zeitraums, ausgenommen das Jahr 1997, ein Fall von Biotinidasemangel auffällig wurde. Alle sechs gefundenen Patienten litten unter einem partiellen Mangel.

4.4 Resultate seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie (TMS)

In Deutschland existieren 13 verschiedene Screeningzentren. Von diesen 13 sind neun in der Lage, ein Screening mittels Tandemmassenspektrometrie durchzuführen. Die restlichen vier Screeningzentren arbeiten mit Laboratorien zusammen, in denen der tandemmassenspektrometrische Teil des Screenings durchgeführt wird.

Für Thüringen befand sich während des Untersuchungszeitraums das verantwortliche Screeningzentrum in Erfurt. Dort wurden die Untersuchungen auf Galaktosämie und Biotinidasemangel durchgeführt. Die tandemmassenspektrometrischen Untersuchungen für die Thüringer Proben fanden im Neugeborenencreeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig statt. Außer den Proben aus Thüringen wurden in diesem Labor auch die Proben aus Hessen über das Screeninglabor Gießen untersucht sowie die Proben des Leipziger Screeningzentrums mit dem Großteil Sachsens selbst. Damit erreicht dieses Screeningzentrum im Jahre 2003 einen Probendurchsatz von etwa 86 000 (Zabransky, 2003) Proben. Daran hat Thüringen einen Anteil von etwa 17% (www.neoscreening.de).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Tandemmassenspektrometrie im Einzelnen dargestellt. Insgesamt wurde der Zeitraum vom 01.11.2001 bis zum 31.12.2003 erfasst, also

zwei Jahre und zwei Monate. Innerhalb dieses Zeitraums wurden 32.508 Kinder untersucht. Im den letzten zwei Monaten 2001 waren es 2.386. Diese beiden Monate möchte ich aus Gründen der Übersichtlichkeit und besseren Vergleichbarkeit ausklammern und mich in den folgenden Betrachtungen zur Tandemmassenspektrometrie auf die Jahre 2002 und 2003 beziehen. Um die Ergebnisse von 2001 nicht völlig zu vernachlässigen, werden sie kurz beschrieben.

Im Jahre 2001 wurden 2386 Neugeborene gescreent. 25 von diesen waren auffällig und erforderten somit ein Zweitscreening (Recall). Daraus resultierten drei positive Befunde. Es wurden drei milde Erkrankungen (zweimal milde Homocysteinämie, einmal milde Methylmalonacidurie) beobachtet. Dies entspricht einer Häufigkeit von etwa 1: 795. Schließt man die milden Formen aus, fanden sich Ende 2001 keine positiven Befunde. Die Recallrate, bezogen auf diese zwei Monate, lag bei 1,05%. Der positive Vorhersagewert, bezogen auf 25 auffällige Erstscreensings und drei bestätigte milde Stoffwechselstörungen, lag somit bei 12%. Des Weiteren fanden sich sieben Fälle von sekundärem Carnitinmangel, diese machten damit ca. 30% der auffälligen Befunde aus.

4.4.1 Ergebnisse von Erstscreening und Zweitscreening (Recall) in Zahlen

In den Jahren 2002 und 2003 wurden insgesamt 30.122 Kinder untersucht. In Tabelle 9 sind 124 durch Tandemmassenspektrometrie auffällige Kinder aus dem Jahre 2002 und 156 auffällige Kinder aus dem Jahre 2003 (insgesamt 280) auf die einzelnen Erkrankungen bzw. Erkrankungsgruppen verteilt dargestellt. Des Weiteren gibt Tabelle 9 die Anzahl an falsch positiven Resultaten an. Für die einzelnen Erkrankungen bestehen deutliche Unterschiede. Die Anzahl der im Recall (Zweitscreening) und in der Folgediagnostik bestätigten Fälle gibt Tabelle 9 wieder.

Im Bereich der Aminosäurestoffwechselstörungen wurden 37 Kinder mit Verdacht auf PKU auffällig. Ab dem Zweitscreening kamen für diese Erkrankung erheblich weniger falsch positive Diagnosen vor. Ebenfalls auffällig wurden Erhöhungen der Aminosäuren Tyrosin und Methionin mit den zugehörigen Verdachtsdiagnosen (Tyrosinämie I, II, III; Homocysteinurie). Für die Homocystinurie wurden zwei milde Fälle bestätigt. Unter den auf Tyrosinämie Verdächtigen fand sich ein transitorischer Fall. Das Screening auf die ausdrücklich zu den empfohlenen Zielerkrankungen gehörende Ahornsiruperkrankung brachte nur wenige Verdachtsfälle hervor. Bisher wurde noch keine Erkrankung nachgewiesen.

Im Bereich der Fettstoffwechselstörungen war vor allem der MCAD-Mangel von Bedeutung. Der positive Vorhersagewert speziell für diese Erkrankung betrug 33% (Tabelle 10). Für Störungen wie den LCHAD-Mangel, den VLCAD-Mangel und den nicht zu den Zielerkrankungen gehörenden SCAD-Mangel wurden nur einzelne Kinder auffällig. Es fand sich eine verhältnismäßig große Anzahl Kinder mit unspezifischen Erhöhungen im Bereich der Acylcarnitine, d.h. dass sich diesen Erhöhungen keine eindeutige Verdachtsdiagnose zuordnen ließ. Dieses Problem existiert auch in Bezug auf unspezifische Erhöhungen der Aminosäuren. Seltener kam es vor, dass sowohl Acylcarnitine als auch Aminosäuren unspezifisch erhöht waren (Tabelle 9).

Im Bereich der Organoacidopathien dominierten die für den 3-MCC-Mangel und die PPA auffälligen Befunde. Als einzige unter allen Erkrankungen erreicht der 3-MCC-Mangel auch im Zweitscreening hohe Werte. Insgesamt 57% der im Erstscreening für den 3-MCC-Mangel auffälligen Kinder zeigten auch im Zweitcreening (Recall) erhöhte Werte. Durch weitere Screenings und Konfirmationsdiagnostik konnten nur zwei milde Fälle und ein maternaler 3-MCC-Mangel nachgewiesen werden. Die PPA erreicht eine Recallrate von 0,06%, allerdings entging 2001 ein erkranktes Kind dem Screening und wurde in der sechsten Lebenswoche klinisch auffällig. Für die GA Typ I oder II fanden sich nur einzelne Verdachtsfälle und keine bestätigten Diagnosen. Das Screening auf die Isovalerialanazidämie brachte 17 auffällige Befunde hervor. Im Zweitscreening war noch ein Kind für die IVA auffällig.

Es gibt einen bestätigten Fall von IVA, der allerdings erst kurz nach Abschluss der Datenerhebung auftrat.

Erhöhungen von Citrullin oder Arginin können Hinweise auf Defekte im Bereich des Harnstoffzyklus sein. Besonders Citrullin wurde häufig auffällig (76% der insgesamt 46 Auffälligen im Jahr 2003). Mit 46 auffälligen Befunden übertraf der Verdacht auf Citrullinämie sogar die Anzahl der Verdachtsfälle auf PKU bzw. HPA (37 Stück). Das Zweitscreening bestätigte nur drei Erhöhungen. In der Folgediagnostik wurde keine Citrullinämie bestätigt. Auch die Erhöhungen von Arginin, in einigen Fällen kombiniert mit Citrullinerhöhungen, führten zu keiner bestätigten Diagnose.

Tabelle 9: Verteilung der auffälligen Befunde in den Jahren 2002 und 2003

| Erkrankung bzw. auffälliger Parameter | Auffälliges Erstscreening | Auffälliges Recall | Bestätigte Fälle | Falsch Positive |
|--|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>empfohlene Zielerkrankungen:</i> | | | | |
| PKU/HPA | 37 | 14 | 9 | 28 |
| MSUD | 3 | 0 | 0 | 3 |
| MCAD-Mangel | 9 | 4 | 4 | 5 |
| VLCAD-Mangel | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LCHAD-Mangel | 1 | 1 | 1 | 0 |
| GA I | 1 | 0 | 0 | 1 |
| IVA | 17 | 1 | 0 | 17 |
| CPT I-Mangel | 1 | 0 | 0 | 1 |
| CPT II-Mangel | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C-AC-T-Mangel | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>andere:</i> | | | | |
| Tyrosinämie | 22 | 4 | 1 | 21 |
| Methionin | 15 | 6 | 2 | 13 |
| 3-MCC-Mangel | 19 | 11 | 2 | 17 |
| PPA | 17 | 1 | 1 | 16 |
| GA II | 1 | 0 | 0 | 1 |
| HMG-CoA-Lyase-Mangel | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SCAD-Mangel | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Arginin | 18 | 3 | 0 | 18 |
| Citrullin | 46 | 3 | 0 | 46 |
| Ornithin | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>unspezifische Erhöhungen:</i> | | | | |
| unspez. erhöhte AC | 26 | 0 | 0 | 26 |
| unspez. erhöhte AS | 17 | 1 | 0 | 17 |
| unspez. erhöhte AC und AS | 8 | 0 | 0 | 8 |
| Carnitinmangel | 7 | 3 | 0 | 7 |
| unbekannt | 12 | | | |
| <i>gesamt:</i> | 280 | 52 | 20 | 260 |

Dargestellt sind die einzelnen, durch die TMS auffällig gewordenen Verdachtsdiagnosen bzw. Screeningparameter, die Anzahl der im Erstscreening Positiven, der Anteil von diesen, der im Recall (= Zweitscreening) auffällig wurde und die Anzahl der bestätigten Diagnosen.

3-MCC-Mangel= 3-Methylcrotonylcarboxylase AC = Acylcarnitine, AS = Aminosäuren, C-AC-T-Mangel = Carnitin-Acylcarnitin-Transferasemangel, CPT = Carnitin-Palmitoyl-Transferase, GA = Glutarazidurie, PPA = Propionazidurie, HMG-CoA-Lyase-Mangel = Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase-Mangel, HPA = Hyperphenylalaninämie, IVA = Isovalerialanazidurie, LCHAD-Mangel-Long-Chain-3Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, MCAD-Mangel = Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, MSUD = Maple Syrup Urine Disease, SCAD-Mangel = Short-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, VLCAD-Mangel, Very-Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase

Die folgenden beiden Diagramme (Abbildung 13 und 14) stellen die Verteilung der positiven Erstscreeningbefunde und der positiven Recalls nach Erkrankungen bzw. Screeningparameter sortiert, bezogen auf die Jahre 2002 und 2003, dar. Die beiden Diagramme verdeutlichen, dass die Häufigkeiten, mit der Erkrankungen auffällig wurden, in den beiden Jahren variierten.

Dabei fällt im Jahr 2002 besonders der hohe Anteil an Kindern mit erhöhter Phe/Tyr-Ratio auf. Auch die unspezifisch erhöhten Aminosäuren und die nicht zu den routinemäßig zu testenden Zielkrankheiten gehörende Citrullinämie waren relativ stark vertreten. Die Veränderungen der Acyl-Carnitine (Carnitinmangel ist nicht dargestellt) machten einen Anteil von 14,5% (Abbildung 13) aus.

Im Jahre 2002 gab es keine auffälligen Befunde für den VLCAD-Mangel, den LCHAD-Mangel, den CPT 2- Mangel, den Carnitin-Acylcarnitin-Translokase-Mangel, den SCAD-Mangel und die Glutarazdurie Typ 2. Einmalig traten im Erstscreening die Verdachtsdiagnosen CPT-1-Mangel, 3-Hydroxy-Isobutyryl-CoA-Hydroxylasemangel sowie die Erhöhung der Aminosäure Ornithin auf. Diese nicht oder nur einmalig auffälligen Kinder sind nicht in Diagramm 13 dargestellt.

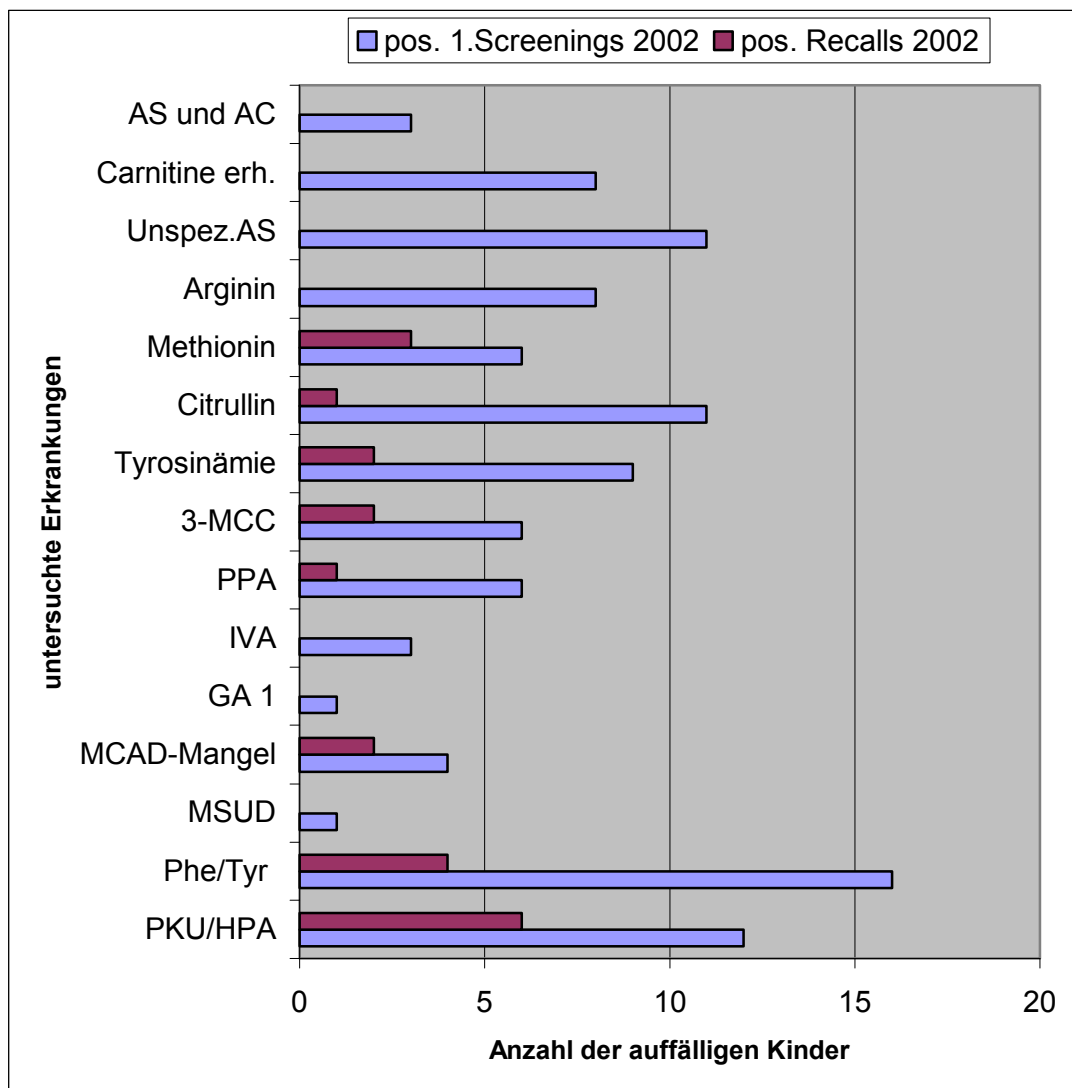
Sieben Fälle von sekundärem Carnitinmangel wurden in 2002 gefunden und behandelt. Die Problematik des sekundären Carnitinmangels wird in Kapitel 5.3.9 diskutiert.

Im Jahre 2003 waren, wie zuvor bereits erwähnt, sehr viele Citrullinerhöhungen im Erstscreening auffällig (22% bezogen auf alle 2003 durch die Tandemmassenspektrometrie Auffälligen), aber auch unspezifische Erhöhungen der Acylcarnitine waren stark vertreten. Prozentual gesehen folgten darauf die Auffälligen für IVA (9%), 3-MCC-Mangel (8%) und Tyrosinämie (8%) (Abbildung 14).

Im Jahre 2003 gab es keine auffälligen Befunde für den VLCAD-Mangel, die Glutarazidurie Typ 1, den CPT 1-Mangel, den Carnitin-Acylcarnitin-Translokasemangel, den sekundären Carnitinmangel, den 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Mangel oder Erhöhungen der Aminosäure Ornithin. Einmalig wurden die Verdachtsdiagnosen SCAD-Mangel und GA-2 gestellt, die sich im Recall nicht bestätigten. Die nicht oder nur in einem Fall auffälligen Erkrankungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Diagramm 14 enthalten.

Ebenfalls nur in einem Fall auffällig war der LCHAD-Mangel. Diese Verdachtsdiagnose bestätigte sich durch die nachfolgenden diagnostischen Maßnahmen. Daher ist das entsprechende Kind in Diagramm 14 dargestellt.

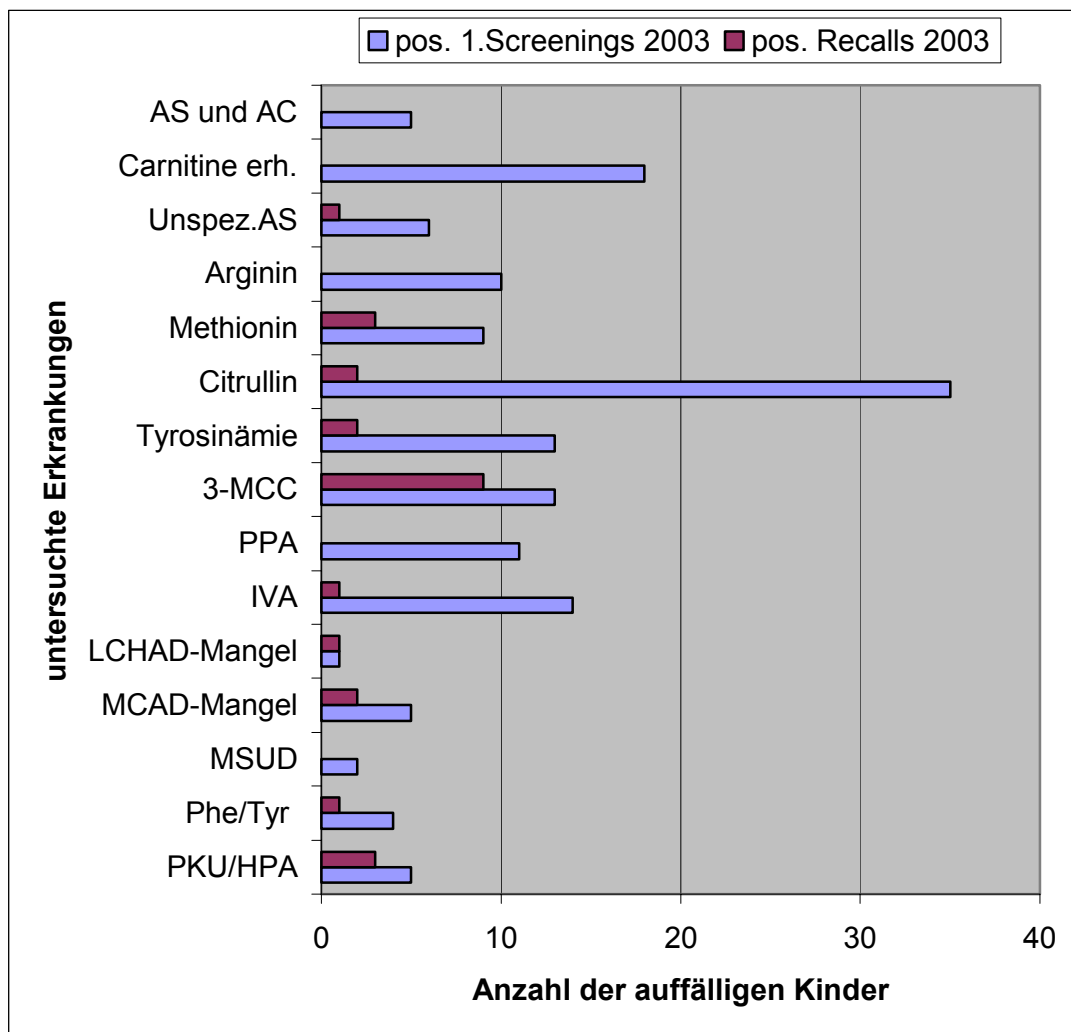
Abbildung 13: Verteilung positiver Erstscreeningbefunde und positiver Recalls 2002



N=124

Die Abbildung stellt den Großteil der in 2002 auffälligen Erst- und Zweitscreeningbefunde graphisch dar. Nicht für alle im Erstscreening auffälligen Erkrankungen fanden sich auch im Zweitscreening Erhöhungen. Nicht oder nur in einem Fall auffällig gewordene Screeningparameter sind nicht dargestellt. Der nur Ende 2001 und in den ersten Monaten 2002 auffällig gewordene Carnitinmangel ist ebenfalls nicht im Diagramm enthalten.

Abbildung 14: Verteilung positiver Erstscreeningbefunde und positiver Recalls 2003



N = 156

Die Abbildung stellt die im Erstscreening und Zweitscreening auffälligen Kinder des Jahres 2003 dar. Nicht für alle im Erstscreening auffälligen Erkrankungen fanden sich auch im Zweitscreening Erhöhungen. Nicht oder nur einmalig auffällige Screeningparameter sind, mit Ausnahme des bestätigten Falles von LCHAD-Mangel, nicht dargestellt

4.4.2 Aus den Ergebnissen resultierende Recallraten und Positive Vorhersagewerte

Aus den in Abschnitt 4.4.1 genannten Zahlen ergaben sich die entsprechenden Recallraten und positiven Vorhersagewerte für die einzelnen Erkrankungen und Erkrankungsgruppen. Die Recallrate für die Tandemmassenspektrometrie insgesamt lag in den beiden betrachteten Jahren bei durchschnittlich 0,93%. (2002: 0,81%; 2003: 1,05%). Was bedeutet, dass durchschnittlich ein Kind von 108 auffällig wurde.

Von den im Erstscreening auffälligen Befunden ließen sich im Zweitscreening 19% der pathologischen Erstscreeningfälle und in der Folgediagnostik 7% bestätigen. Dies entspricht

einem positiven Vorhersagewert von 7% (2002: 9,6%; 2003: 5,1%), bezogen auf alle Erstscreensings durch Tandemmassenspektrometrie.

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, ist der positive Vorhersagewert für die in der Tandemmassenspektrometrie erfassten Krankheitsgruppen (Aminoazidopathien, Fettstoffwechselstörungen, Organoacidopathien, Harnstoffzyklusdefekte) verschieden. So liegt er für die Aminoazidopathien bei 16% und für die Fettstoffwechselstörungen bei 38%. Besonders großen Anteil an diesen Ergebnissen haben die PKU bzw. HPA (im Bereich der Aminosäurestoffwechselstörungen) und der MCAD-Mangel (im Bereich der Fettstoffwechselstörungen), die in ihren jeweiligen Gruppen sowohl die meisten im Screening auffälligen Kinder als auch die meisten bestätigten Diagnosen lieferten. Für die Organoazidopathien liegt der positive Vorhersagewert bei 7% und entspricht damit genau dem Durchschnittswert.

Für die Harnstoffzyklusdefekte betrug die Recallrate 0,22%. Die unspezifischen Erhöhungen kamen insgesamt auf eine Recallrate von 0,17%. Darin enthalten sind unspezifische Erhöhungen der Aminosäuren, der Acylcarnitine sowie Kinder mit unspezifischen Erhöhungen in beiden Gruppen. Da sich weder für die Harnstoffzyklusdefekte noch unter den Kindern mit unspezifischen Erhöhungen einzelner Metabolite tatsächlich Krankheitsfälle fanden, können hierfür keine positiven Vorhersagewerte angegeben werden. Diese beiden Gruppen trugen also wesentlich dazu bei, dass der positive Vorhersagewert bei insgesamt nur 7 % lag.

Tabelle 10: Kontrollbedürftige und falsch positive Befunde 2002 und 2003

| Erkrankung bzw. auffälliger Parameter | Auffällige | Recallrate in % | Falsch Positive | Positiver Vorhersagewert |
|---|------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| <i>Aminoazidopathien</i> | | | | |
| PKU/HPA (inkl.Phe/Tyr) | 37 | 0,12 | 28 | 24% |
| MSUD | 3 | 0,01 | 3 | 0% |
| Methionin | 15 | 0,05 | 13 | 13% |
| Tyrosin | 22 | 0,07 | 21 | 4,50% |
| Zwischensumme: | 77 | 0,26 | 65 | 16% |
| <i>Fettstoffwechselstörungen</i> | | | | |
| MCAD-Mangel | 9 | 0,03 | 5 | 44% |
| LCHAD-Mangel | 1 | 0,003 | 0 | 100% |
| CPT I-Mangel | 1 | 0,003 | 1 | 0% |
| SCAD-Mangel | 1 | 0,003 | 1 | 0% |
| MAD-Mangel (GA II) | 1 | 0,003 | 1 | 0% |
| Zwischensumme: | 13 | 0,04 | 8 | 38% |
| <i>Organoazidopathien</i> | | | | |
| GA I | 1 | 0,003 | 1 | 0% |
| IVA | 17 | 0,06 | 17 | 0% |
| 3-MCC | 19 | 0,06 | 17 | 10,5% |
| PPA | 17 | 0,06 | 16 | 6% |
| HMG-CoA-Lyase-Mangel | 1 | 0,003 | 1 | 0% |
| Zwischensumme: | 55 | 0,18 | 51 | 7% |
| <i>Harnstoffzyklusdefekte</i> | | | | |
| Arginin | 18 | 0,06 | 18 | 0% |
| Cirullin | 46 | 0,15 | 46 | 0% |
| Ornithin | 1 | 0,003 | 1 | 0% |
| Zwischensumme: | 65 | 0,22 | 65 | 0 |
| <i>unspezifische Erhöhungen</i> | | | | |
| unspez. erhöhte AC | 26 | 0,09 | 26 | 0% |
| unspez. erhöhte AS | 17 | 0,06 | 17 | 0% |
| unspez. erhöhte AC und AS | 8 | 0,03 | 8 | 0% |
| Zwischensumme | 51 | 0,17 | 51 | 0% |
| Carnitinmangel | 7 | 0,02 | 7 | 0% |
| unbekannt | 12 | 0,04 | 12 | 0% |
| Gesamt: | 280 | 0,93 | 260 | 7% |

N = 30122

Verteilung der Screeningresultate nach Erkrankungen beziehungsweise Erkrankungsgruppen, Es werden für jeden auffällig gewordenen Screeningparameter beziehungsweise jede Verdachtsdiagnose die Recallrate und der positive Vorhersagewert angegeben. Die Gesamtsumme bezieht sich auf die in Thüringen in den Jahren 2002 und 2003 durchgeführte TMS.

4.4.3 Bestätigte Fälle

Aus der Anzahl der durchgeführten Screenings, der auffälligen Befunde im Recall und in der Konfirmationsdiagnostik resultierten 23 bestätigte Diagnosen (Tabelle 11). Es handelt sich dabei um sechs PKU- und drei HPA-Fälle, vier Fälle von MCAD-Mangel, ein Fall von LCHAD-Mangel und eine Propionazidämie. Neben diesen wurden außerdem vier Fälle von milder Homocystinurie, ein Fall von milder Methylmalonazidämie, zwei Fälle von mildem 3-MCC-Mangel sowie ein Fall von transitorischer Tyrosinämie auffällig. Für diese 23 bestätigten Diagnosen resultierte, bezogen auf die Anzahl der untersuchten Kinder, eine Frequenz von 1:1413. Wenn man nur die in den Screeningrichtlinien als Zielerkrankungen ausgewiesenen Störungen betrachtet, resultiert für die positiven Befunde eine Frequenz von 1:2322. Der sekundäre Carnitinmangel wurde im ersten Anwendungshalbjahr 13mal auffällig und vorsorglich durch Carnitinsubstitution therapiert. Seine Bedeutung wird in Abschnitt 5.3.9 besprochen. Zusätzlich wurde ein Fall von maternalem 3-MCC-Mangel nachgewiesen. Ein Fall von PPA wurde klinisch auffällig.

Tabelle 11: Positive Resultate der Tandemmassenspektrometrie (TMS);

| Positive Fälle TMS 11-12 2001 | Positive Fälle 2002 | Positive Fälle 2003 |
|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| | 6x PA (3xPKU, 3xHPA) | 3x PKU |
| 1x milde Homocystinurie | 2x MCAD-Mangel | 1x MCAD-Mangel |
| 1x milde transitorische Homocystinurie | 1x milde Homocystinurie | (1x milder MCAD-Mangel) |
| | 1x transitorische Tyrosinämie | 1x LCHAD-Mangel |
| 1x milde Methylmalonazidurie | 1x Propionazidurie | 1x milde Homocystinurie |
| 6x sekundärer Carnitinmangel | 7x sekundärer Carnitinmangel | |
| | 1 klinisch auffällige Propionazidurie | 2x 3-MCC-Mangel |
| | 1x maternaler 3-MCC-Mangel | |

Die Tabelle zeigt 23 auf der Tandemmassenspektrometrie beruhende Diagnosen bei gescreenten Kindern. Des Weiteren wurde eine maternale PKU durch das Screening gefunden. Ein Fall von PPA wurde klinisch auffällig, nachdem er im Erstscreening einen grenzwertig normalen Befund zeigte und deshalb nicht weiter durch ein Zweitscreening verfolgt wurde. Dieser Sachverhalt konnte nach Diagnosesicherung im selektiven Screening aufgeklärt werden. Die insgesamt 13 Kinder, die durch einen sekundären Carnitinmangel auffällig wurden, werden in Abschnitt 5.3.9 besprochen.

Im Jahre 2002 wurden elf Erkrankungen durch die Tandemmassenspektrometrie gefunden. Das entspricht einer Häufigkeit von 1:1.383. Bei fünf dieser elf Erkrankungen handelt es sich um milde, nicht behandlungsbedürftige Erkrankungen. Neun Erkrankungen wurden 2003 durch die Tandemmassenspektrometrie entdeckt, das entspricht einer Häufigkeit von 1:1.656.

Unter diesen waren vier milde Formen. Insgesamt ergibt sich also, dass zwölf der dreiundzwanzig (52%) gefundenen Fälle milde Varianten der Zielerkrankungen darstellen.

4.5 Die Aminosäurestoffwechselstörungen

Die Phenylketonurie wurde bereits ausführlich besprochen. Die Untersuchung auf weitere Aminosäurestoffwechselstörungen erbrachte, abgesehen von vier milden Homocystinurien und einer transitorischen Tyrosinämie, keine weiteren bestätigten Diagnosen.

4.6 Ergebnisse für Störungen des Fettsäurestoffwechsels

4.6.1 Ergebnisse des Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangels (MCADD)

In Thüringen fanden sich zwischen November 2001 und Dezember 2003 durch Tandemmassenspektrometrie vier bestätigte Fälle von MCAD-Mangel (wenn die milden Fälle einbezogen werden), was einer Häufigkeit von 1:8.000 entspricht. Bei einem der hier in Jena nachverfolgten Fälle (2003 geboren) normalisierten sich die auffälligen Screeningparameter im Alter von drei bis vier Monaten. Des Weiteren existiert unter den auffällig gewordenen Kindern ein Fall von mildem MCAD-Mangel, bei dem die Behandlung in der Universitätskinderklinik Leipzig fortgeführt wurde. Daher können über diesen Fall im Verlauf keine Angaben gemacht werden. Mit zwei bestätigten Fällen, zwei Fällen von mildem MCAD-Mangel und fünf falsch positiven Befunden liegt die Recallrate bezogen auf die Erkrankung bei durchschnittlich 0,03%. Vor der Einführung der Tandemmassenspektrometrie wurde 1999 ein weiteres Kind mit MCAD-Mangel geboren und im Alter von 2 ¼ Jahren durch hypoglykämische Episoden mit Bewusstseinsstörungen erstmals klinisch auffällig. Im November 2002 wurde bei dieser Patientin schließlich im selektiven Stoffwechselscreening durch Tandemmassenspektrometrie der MCAD-Mangel nachgewiesen und durch die Untersuchung der organischen Säuren im Urin sowie molekulargenetisch bestätigt.

Für drei der insgesamt fünf bekannten MCAD-Fälle liegen Genanalysen vor. Diese ergaben in zwei Fällen das homozygote Vorliegen der verbreiteten Mutation 985 A>G (K304E) und in einem Fall eine Compound-Heterozygotie für die Mutationen K304E und Y42C. Tabelle 12 stellt die im Neugeborenencreening ermittelten Werte für die bestätigten Fälle dar.

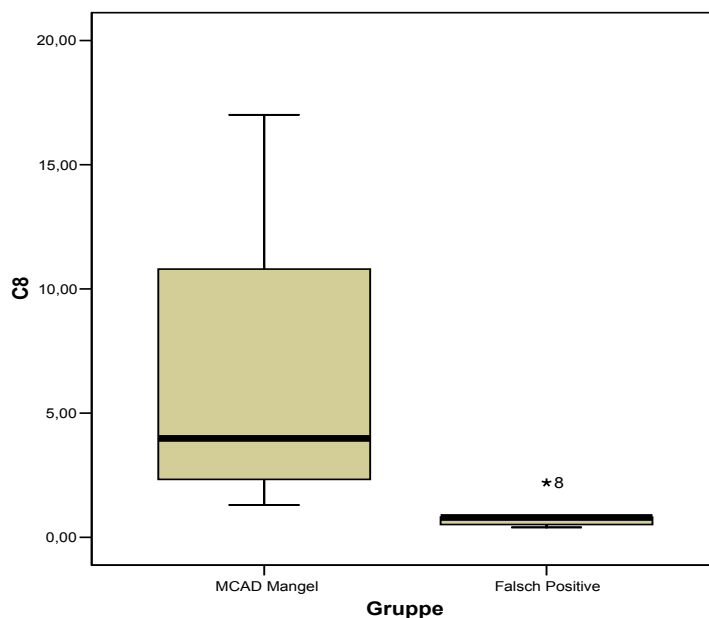
Für die nur einmalig im Rahmen des Neugeborenencreenings auffälligen Kinder lagen die jeweils auffälligen Werte (z.B. C8 zw. 0,5 und 2,2) im Allgemeinen niedriger als bei den schließlich bestätigten Fällen. Den Unterschied hinsichtlich des Leitparameters C8 zwischen der Gruppe der MCAD-Mangel-Patienten (mehr als einmalig auffällig) und der Falsch Positiven (nur im Erstscreening auffällig) verdeutlicht dabei das Boxplot-Diagramm in Abbildung 15.

Tabelle 12: Screeningwerte für Kinder mit nachgewiesenem MCAD-Mangel

| Bestätigte Fälle Cut-Off-Werte ($\mu\text{mol/L}$) | C6 | C8 | C10:1 | C10 | C8/C10 | C8/C12 | C8/C16 |
|--|------|------|-------|------|---------|--------|--------|
| Patient 1* (homozygot für K304E) | | 3,95 | 1,16 | 0,56 | 7,0 | | |
| Patient 2 (heterozygot K304E/Y42C) | 0,7 | 4,6 | 0,38 | 0,69 | 6,65 | 19,9 | 1,54 |
| Patient 3 (homozygot für K304E) | 1,74 | 17,0 | 1,26 | 1,56 | 10,9 | 42,8 | 5,47 |
| Patient 4 (keine Genetik durchgeführt) | 0,46 | 1,31 | 0,31 | | | 8,48 | 0,51 |
| Patient 5 (milder MCAD-Mangel) | 0,56 | 3,37 | 0,83 | 1,67 | 2,02(n) | 11,18 | 0,9 |

Die Tabelle stellt die durch Tandemmassenspektrometrie ermittelten Werte dar, durch die die Patienten mit der bestätigten Diagnose MCAD-Mangel auffällig wurden. Patient 1 wurde bereits 1999 geboren und durch eine klinische Symptomatik auffällig. Patient 5 wurde an der Universitätsklinik Leipzig weiterbehandelt. Dort wurde die Diagnose milder MCAD-Mangel gestellt. Alle Messwerte sind in $\mu\text{mol/L}$ angegeben, * Werte bei Diagnosestellung im November 2002, n normaler Wert

Abbildung 15: Octanoyl-Carnitin (C8) bei MCAD-Mangel-Patienten und falsch Positiven



MCAD-Mangel:
N = 4
Mittelwert = 6,57
Untere Grenze: - 4,70
Obere Grenze: 17,84
Median = 3,99

Falsch Positive:
N = 5
Mittelwert = 0,95
Untere Grenze: 0,05
Obere Grenze: 1,85
Median = 0,8

Dargestellt ist der Unterschied hinsichtlich der Höhe des Screeningparameters C8 im Erstscreening. Die Gruppe MCAD-Mangel steht für Patienten, bei denen eine Form von MCAD-Mangel nachgewiesen wurde beziehungsweise für Patienten die mehrfach für C8 auffällig wurden. Die Kinder in der Gruppe „falsch Positive“ waren ausschließlich im Erstscreening auffällig.

4.6.2 LCHAD-Mangel (LCHADD) und VLCAD-Mangel (VLCADD)

Ein Fall von LCHAD-Mangel konnte im betrachteten Zeitraum gefunden werden. Das Kind wurde auffällig durch rezidivierende Zustände mit Nahrungsverweigerung, Erbrechen und Entwicklung einer Kardiomyopathie. Unter Einstellung auf kohlenhydratreiche fettreduzierte Diät mit häufigen Mahlzeiten und Vermeidung von Fastenpausen > 6 Stunden sowie restriktiver Korrektur erniedrigter Carnitinwerte durch Substitution von L-Carnitin wurde eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht.

Im Neugeborenenenscreening war das betreffende Kind durch geringfügig erhöhtes C12, C14:1 und C14-OH auffällig. Die Parameter C16:1-OH, C16-OH, C18:1-OH und C18-OH waren stark erhöht.

Außer dem klinisch bestätigten Fall wurde kein weiteres Kind mit eindeutigem Verdacht auf LCHAD-Mangel gefunden. 2001 wurde bei einem Kind die Verdachtsdiagnose VLCAD-Mangel gestellt. Dieser Verdacht bestätigte sich in der Konfirmationsdiagnostik nicht.

4.7 Störungen im Stoffwechsel organischer Säuren

4.7.1 3-MCC-Mangel

Zwischen November 2001 und Dezember 2003 wurden in Thüringen 19 Kinder mit Verdacht auf 3-MCC-Mangel auffällig. Das entspricht einer Recallrate von 0,06 %. Unter diesen 19 im Erstscreening Positiven konnte bei zwei Kindern der Verdacht auf einen 3-MCC-Mangel bestätigt werden. Bei diesen zwei Fällen handelt es sich um relativ milde Varianten, da die wiederholt gemessenen Werte für 3-HIVA zwar deutlich über dem Cut-Off-Wert von 0,8 lagen, aber auch deutlich unter 5 µmol/l. Eine Erhöhung über diesen Wert wird vom zuständigen Screeninglabor als typisch für einen gesicherten 3-MCC-Mangel angegeben. Ein Fall von homozygotem 3-MCC-Mangel wurde bei der Mutter eines auffälligen Kindes nachgewiesen.

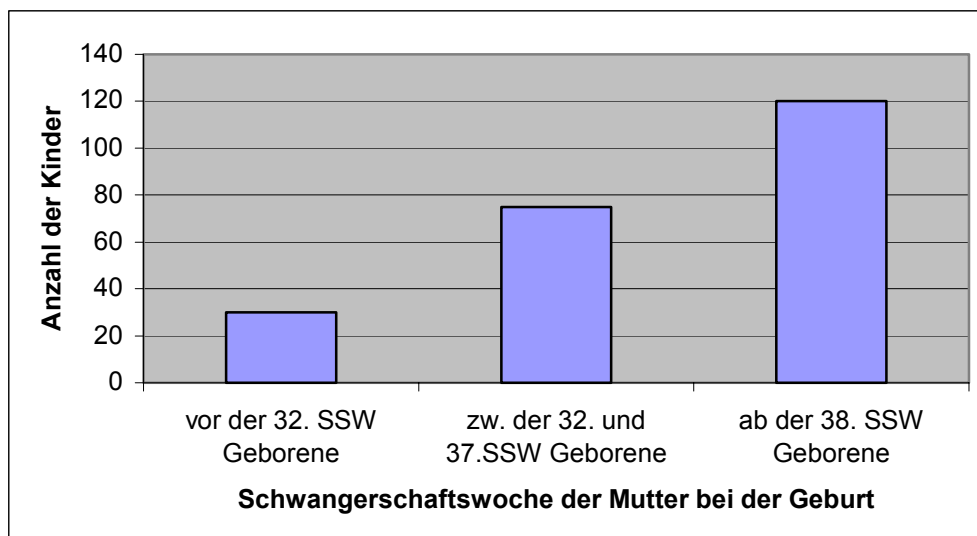
Die für 3-MCC-Mangel auffälligen Kinder zeigten, dass die Anzahl falsch positiver Kinder nicht nur ein Problem für das Erstscreening darstellte, sondern sich auf die Recallbefunde fortsetzte. Von 17 falsch Positiven im Erstscreening waren neun (53%) auch im Recall auffällig. Bei vier dieser Kinder, darunter das Kind, bei dem schließlich für die Mutter der 3-MCC-Mangel nachgewiesen werden konnte, waren die Werte für das 3-HIVA auch noch nach dem Recall mehrfach positiv. Bei einigen der mehrfach für 3-HIVA auffälligen Kinder fanden sich im Rahmen der Abklärung wiederholt grenzwertige bis leicht erhöhte Metabolite (z.B. die org. Säure 3-Methylcrotonylglycin), was ebenfalls ein Hinweis auf den 3-MCC-Mangel ist.

4.8 Einfluss des Gestationsalters auf das Neugeborenencreening durch TMS

Von den insgesamt 305 Kindern, die in der Tandemmassenspektrometrie durch ein Erstscreening auffällig wurden, konnte für 225 der Geburtszeitpunkt aus Akten und mit Hilfe des Screeningzentrums in Erfurt in Erfahrung gebracht werden. Die Aufteilung dieser 225 Kinder nach dem Gestationsalter stellt das Säulendiagramm in Abbildung 16 dar. Dabei zeigt sich, dass insgesamt 105 (46,67%) der 225 Kinder Frühgeburten (< 38. SSW) waren. Wiederum 30 (13,33%), bezogen auf die 225 Kinder mit bekanntem Geburtszeitpunkt, wurden im siebten Schwangerschaftsmonat oder früher geboren und sind damit sehr oder extrem frühe Frühgeburten (Abbildung 16).

Nach Angaben von Statistiken, die auf dem Körpergewicht (bzw. Geburtszeitpunkt) basieren, sind durchschnittlich 6% aller Lebendgeborenen Frühgeburten (Stauber und Weyerstahl 2001). Der Anteil der kleinen Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1500g (<32. SSW) liegt bei ca. 1% (www.Medicine-Worldwide 2004).

Abbildung 16: Auffällige unterteilt nach Gestationsalter (N = 225)

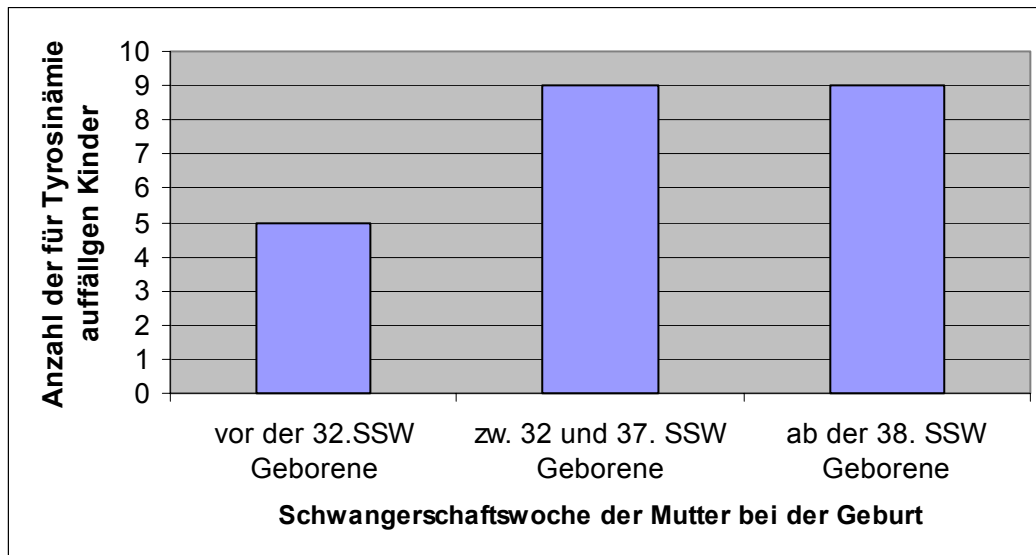


Dargestellt sind 225 im Thüringer Neugeborenencreening auffällige Kinder, für die das Gestationsalter bekannt ist. Erkennbar ist eine Verschiebung in Richtung Frühgeburtnlichkeit im Vergleich zur Normalbevölkerung.

Für die einzelnen auffälligen Parameter liegt eine unterschiedliche Altersverteilung vor. Während bei Tyrosinämieverdachtsfällen sehr viele der auffälligen Kinder Frühgeburten bzw. sehr frühe Frühgeborene waren (Abbildung 17), zeigt sich, dass fast alle für Citrullinämie auffälligen Kinder Reifgeborene waren, also zwischen der 38. und 42. Woche zur Welt kamen (Abbildung 18).

Es waren insgesamt 23 Kinder durch erhöhtes Tyrosin auffällig, davon waren nur neun (39%) Reifgeborene. Insgesamt 14 Kinder (61%) wurden zu früh geboren, neun (39%) zwischen der 32. und 37. SSW und fünf (22%) noch vor der 32.SSW.

Abbildung 17: Gestationsalter bei Tyrosinerhöhung (N = 23)



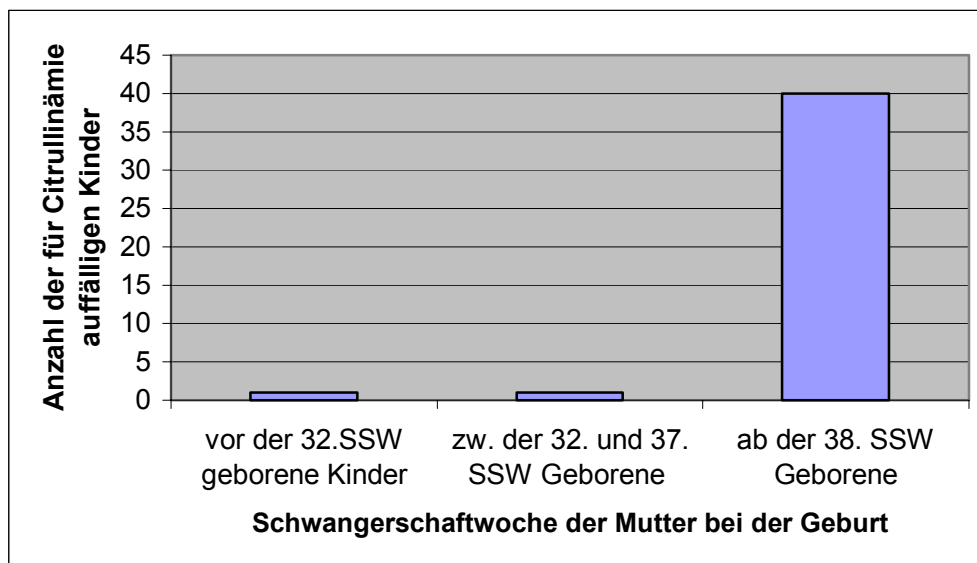
Das Diagramm zeigt den Geburtszeitpunkt von 24 für die Aminosäure Tyrosin auffälligen Kindern. Die dargestellten Kinder sind zu über 60% Frühgeburten, ca. ein Drittel dieser Kinder kam vor der 32. SSW zur Welt.

Die Verteilung der Citrullinämieverdachtsfälle hinsichtlich des Gestationsalters ist in Abbildung 18 dargestellt. Für 42 der insgesamt 47 für diesen Parameter auffälligen Kinder konnte der Geburtszeitpunkt im Nachhinein ermittelt werden.

Die Aminosäure Citrullin stellt sich im Vergleich mit Tyrosin vollkommen gegensätzlich dar. Kaum eines der auffälligen Kinder war eine Frühgeburt. Die Verteilung ähnelt damit stark der der Normalbevölkerung. Exakt nur 4,26% (= 2 Kinder) entfielen auf die Gruppe der frühgeborenen Kinder.

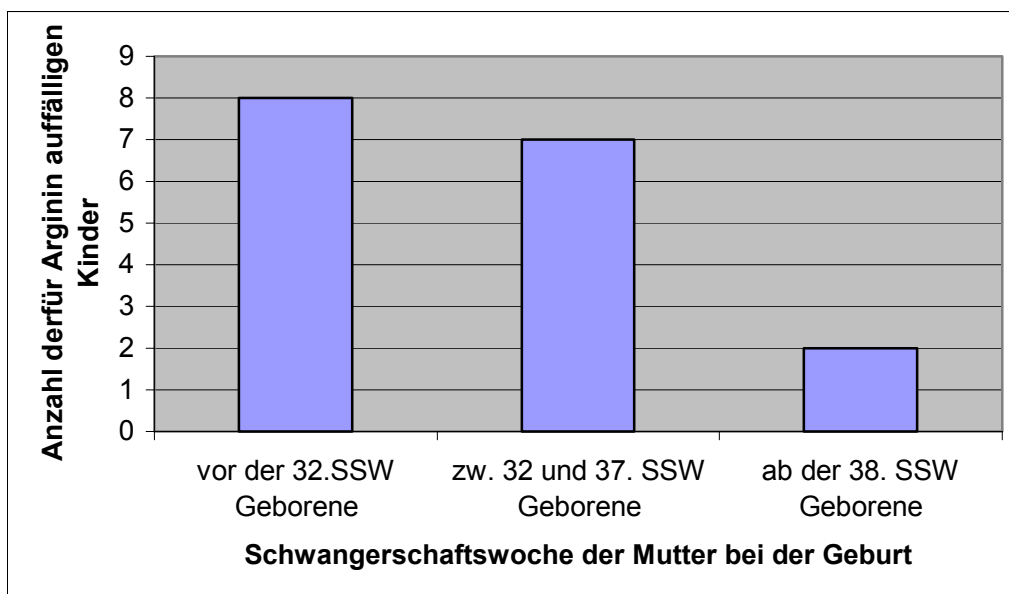
Arginin ist genau wie Citrullin Bestandteil des Harnstoffzyklus. Die Verteilung hinsichtlich des Geburtszeitpunktes ist, ähnlich wie bei Tyrosin, stark in Richtung der frühgeborenen Kinder verschoben (Abbildung 19). Dabei steht dieser Zeitpunkt für 17 von insgesamt 21 Kindern fest. Man kann erkennen, dass die Verteilung zu Gunsten der Frühgeborenen für Arginin noch stärker ausgeprägt ist als für Tyrosin. Insgesamt wurden 47 % der auffälligen Kinder vor der 32. SSW geboren, 41 % zwischen der 33. und 37. SSW und nur rund 12 % nach vollendeter 37.SSW.

Abbildung 18: Gestationsalter für Citrullinerhöhung (N = 42)



Das Diagramm zeigt den Geburtszeitpunkt von 42 für die Aminosäure Citrullin auffälligen Kindern. Fast alle dargestellten Kinder waren Reifgeborene. Nur zwei Kinder waren Frühgeburten, wovon eines vor der 32.SSW zur Welt kam

Abbildung 19: Gestationsalter bei Argininerhöhung (N = 17)



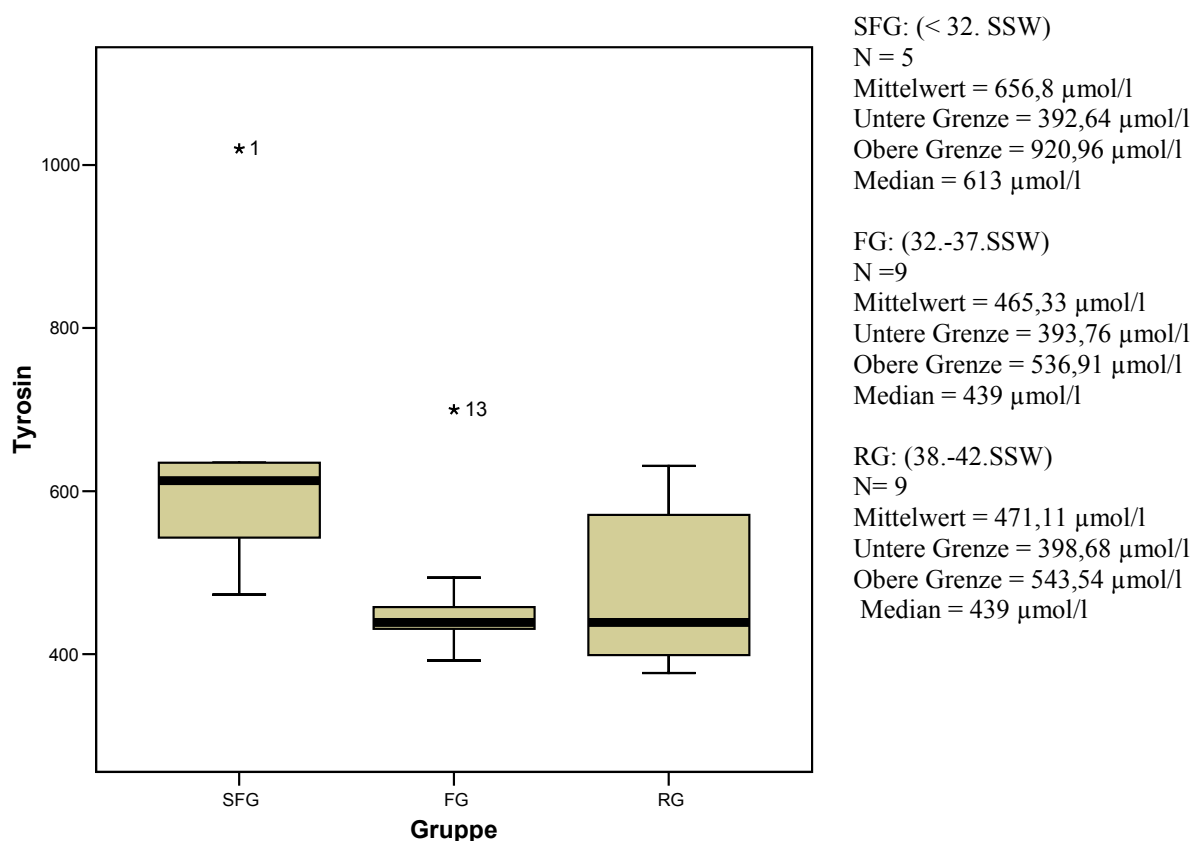
Das Diagramm zeigt den Geburtszeitpunkt von 17 für die Aminosäure Arginin auffälligen Kindern. Bei den dargestellten Kindern handelte es sich bei 88% um Frühgeburten, ca. die Hälfte von diesen Kindern kam vor der 32. SSW zur Welt.

Keines der auffälligen Kinder, für welches die Schwangerschaftswoche zum Geburtstermin bekannt ist, wurde später als in der 42.SSW geboren, sodass Übertragung als Grund für ein auffälliges Neugeborenenenscreening ausscheidet.

Für einige Screeningparameter wird ein Zusammenhang zwischen Geburtszeitpunkt und Höhe des auffälligen Wertes angenommen, bzw. wird vermutet, dass Frühgeborene, insbesondere Kinder, die noch vor der 32. SSW zur Welt gekommen sind, ein erhöhtes Risiko haben, im Neugeborenen Screening auffällig zu werden. Daher ist in den aktuellen Screeningrichtlinien (Anhang A2) festgelegt, dass bei allen vor der 32. SSW geborenen Kindern, zusätzlich zum regulären Neugeborenen Screening am dritten Lebenstag, ein weiteres Screening im korrigierten Alter von 32 Schwangerschaftswochen durchgeführt werden soll (Hess 2005). Auch in den 2002 erschienen Richtlinien wurde bereits ein solches Vorgehen empfohlen.

Wie sich der Geburtszeitpunkt auf die Höhe eines Screeningparameters auswirken kann, wird am Beispiel des Tyrosins gezeigt (Abbildung 20).

Abbildung 20: Höhe der auffälligen Tyrosin-Werte in Abhängigkeit vom Alter bei der Geburt



Dargestellt ist der Grad der Erhöhung der Aminosäure Tyrosin in Abhängigkeit vom Geburtszeitpunkt der Kinder. Für die Gruppe SFG (Kinder, die vor der 32.SSW geboren wurden) lagen diese Tyrosin-Werte signifikant höher als für die anderen Gruppen.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (RF, FG, SFG) besteht. Diese Gruppen sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt. Der Mann-

Whitney-Test wurde daraufhin auf alle in Frage kommenden Paarungen angewandt. Es zeigte sich, dass sowohl zwischen den Gruppen RG und SFG ($p = 0,042$) als auch zwischen den Gruppen FG und SFG ($p = 0,019$) ein signifikanter Unterschied auf dem 5%-Niveau besteht. Die Gruppen FG und RG unterscheiden sich nicht signifikant.

Wie sich die Verteilung auf Frühgeborene und Reifgeborene hinsichtlich der weiteren Screeningparameter verhält, ist aus Tabelle 13 ersichtlich.

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen auffälligem Screeningparameter und Gestationsalter

| Erkrankung | Frühgeburten vor der 32. SSW | Frühgeburten zw. der 32. und 37. SSW | Reifgeborene |
|-----------------------|---------------------------------|---|--------------|
| Phenylalanin | 2 | 6 | 4 |
| Tyrosin | 5 | 9 | 9 |
| Phe/Tyr | 3 | 7 | 5 |
| MSUD | 1 | | |
| MCAD-Mangel | 0 | 1 | 6 |
| LCHAD-Mangel | 0 | 2 | 0 |
| IVA | | 4 | 8 |
| PPA | 2 | 4 | 7 |
| 3-MCC-Mangel | | 4 | 9 |
| Citrullin | 1 | 1 | 40 |
| Arginin | 8 | 7 | 2 |
| Methionin-Erhöhung | 1 | 6 | 6 |
| Aminosäuren unspez. | 2 | 8 | 5 |
| Acylcarnitine unspez. | 3 | 8 | 15 |
| AS und AC unspez. | 1 | 5 | |
| Carnitinmangel | 1 | 3 | 4 |

N = 225, In den beiden Spalten für „Frühgeburten“ und der Spalte für „Reifgeborene“ ist die jeweilige Anzahl von in Thüringen geborenen Kindern angegeben, die für die in Spalte eins genannte Erkrankung bzw. für den entsprechenden Screeningparameter auffällig waren. Es konnten nur die Kinder berücksichtigt werden, für das Gestationsalter bekannt war. Es wird deutlich, dass die Verteilung der auffälligen Kinder auf die Spalte „Frühgeborene“ bzw. „Reifgeborene“ in Abhängigkeit von der in Spalte eins genannten Erkrankung stark variiert.

Für das Galaktosämie- und Biotinidase-Screening lassen sich rückblickend keine Angaben machen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden retrospektiv sieben Jahre des Thüringer Neugeborenencreenings erfasst und vorgestellt. Im Erfassungszeitraum vom 01.01.1997 bis zum 31.12.2003 vollzogen sich wesentliche methodische Veränderungen, insbesondere mit der Erweiterung des Neugeborenencreenings durch die Tandemmassenspektrometrie (TMS). Auch kam es zu methodischen Veränderungen im Galaktosämiescreening.

Im April 2005 wurde mit dem Inkrafttreten neuer Richtlinien zum Neugeborenencreening (Anhang A2) für die Thüringer Neugeborenen eine Verlagerung des Neugeborenencreenings in das Neugeborenencreeninglabor des Uniklinikums Leipzig vorgenommen.

Dadurch konnte der Empfehlung zur Vermeidung eines Probensplittings und einer Mindestuntersuchungszahl von 50.000 Untersuchungen pro Jahr im beauftragten Labor Rechnung getragen werden.

Andererseits ging damit die Ära eines regionalen Thüringer Neugeborenencreenings, das nach der Wiedervereinigung erfolgreich etabliert werden konnte, zu Ende. Diese Arbeit nutzt somit die historische Chance der Aufarbeitung von Daten des Thüringer Neugeborenencreenings.

In der Diskussion werden im Folgenden wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich mit Literaturdaten näher analysiert und bewertet.

Insgesamt 111.845 Kinder wurden in dieser Zeit gescreent, 32.508 davon durch die Tandemmassenspektrometrie. Dabei wurde insbesondere auf die Einführung der Tandemmassenspektrometrie im Jahre 2001 und die aus diesem Verfahren hervorgegangenen Ergebnisse Wert gelegt. Die Ergebnisse, die aus den konventionellen Screeningverfahren auf PKU, Galaktosämie und Biotinidase hervorgegangen sind, wurden ebenfalls erfasst und ausgewertet. Basierend auf den zum damaligen Zeitpunkt existierenden Screeningrichtlinien wurden in dieser Arbeit auch Erkrankungen erfasst, deren Untersuchung nach den aktuellen Leitlinien untersagt ist (z.B. der 3-MCC-Mangel oder die Propionazidämie).

5.1 Bezugsdaten

Die Anzahl der Kinder, die in Thüringen in den betrachteten Jahren (1997 bis 2003) geborenen bzw. untersucht wurden, zeigt Tabelle 2. Dabei ist von 1997 bis 2000 ein leichter Anstieg der Anzahl an Lebendgeburten auszumachen. Von 2001 bis 2003 ist die Anzahl der Lebendgeburten rückläufig. Parallel zu diesem Verlauf hat sich die Anzahl der Screenings entwickelt. Dabei fällt eine zunehmende Differenz zwischen der Anzahl der gescreenten und der Anzahl der in Thüringen lebendgeborenen Kinder auf. Es ist zu festzustellen, dass diese

Differenz im Beobachtungszeitraum unabhängig von der Entwicklung der Geburtenanzahl zunimmt. Dieser, vor allem in den letzten drei Jahren erkennbare Rückgang der Screeninguntersuchungen erklärt sich vor allem daraus, dass ein Teil der Screenings in anderen Bundesländern stattgefunden hat. Kinder, die nicht in Thüringen untersucht wurden, konnten demzufolge nicht von der zuständigen Stelle in Erfurt erfasst werden. Ein eher unwesentlicher Anteil an der Differenz zwischen Lebendgeburten und Screenings kann auf die Verweigerungen der Untersuchung durch die Eltern zurückgeführt werden. Graphisch ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der Lebendgeburten und der Anzahl der Screenings in Abbildung 6 dargestellt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten alle in Thüringen existierenden Kliniken, Geburtshäuser und Hebammen angehalten werden die Trockenblutproben des Neugeborenencreenings in das für Thüringen offiziell zuständige Labor zu senden. Nur so kann eine vollständige Erfassung gewährleistet und ein umfassender Überblick über die Häufigkeit von angeborenen Stoffwechselerkrankungen in Thüringen gewonnen werden. Die vollständige Datenerfassung wird durch eine willkürliche und dezentrale Versendung der Trockenblutproben stark erschwert. Für die vorliegende Arbeit konnten nur die Daten verwertet werden, die über das Screeningzentrum in Erfurt erfasst wurden bzw. die Informationen zur Tandemmassenspektrometrie, die das dafür zuständige Neugeborenencreeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig ermittelt hatte.

5.2 Die Ansprüche an das Neugeborenencreening, die Screeningkriterien und ihre Bedeutung für die Tandemmassenspektrometrie

5.2.1 Die Häufigkeiten der Erkrankungen und ihre Bedeutung für das Neugeborenencreening

Für Stoffwechselerkrankungen, die schon seit vielen Jahren durch konventionelle Screeningmethoden untersucht wurden, ist die Häufigkeit mit ausreichender Sicherheit bekannt. So zeigt die klassische PKU eine Häufigkeit von ca. 1:8.500 (Seidel et al. 2002) und die klassische Galaktosämie von 1:45.000 (Podskarbi und Bieger 1995) Der vollständige Biotinidasemangel ist mit 1: 160.000 (Zabransky 2001) eher selten.

Für die Erkrankungen, die erst seit der Einführung der Tandemmassenspektrometrie im November 2001 erfasst werden können, ist die Frage nach der zu erwartenden Häufigkeit in Thüringen noch nicht mit absoluter Sicherheit zu beantworten. Erfahrungswerte aus anderen Ländern, wie den USA oder Australien, können nur erste Hinweise liefern. Vergleiche mit in Deutschland durchgeführten Studien, wie dem bayerischen Modellprojekt (Liebl et al. 2001a), sind nicht mit absoluter Sicherheit als Orientierung geeignet, da für viele Erkrankungen

regionale Unterschiede in Bezug auf ihre Häufigkeit existieren (Naughten 1998, Hoffmann et al. 2004).

In Hinblick auf die Häufigkeit scheint auch für Thüringen erwiesen zu sein, dass insbesondere der MCAD-Mangel mit 1:10.000, die Glutarazidämie mit 1:30.000 (Seidel et al. 2002), der 3-MCC-Mangel mit 1:40.000 (Liebl et al. 2002) und die Propionazidämie mit einer Häufigkeit von 1:50.000 (Stach et al. 2002) von besonderer Bedeutung sind. Dies spielt vor allem in Hinblick auf die nüchterne Frage nach dem Kosten-Nutzen-Verhältnis des Neugeborenen-screensings keine unerhebliche Rolle. Abhängig von der Schwere der Erkrankung sowie den existierenden Behandlungsmöglichkeiten, sind erst ab einer bestimmten Anzahl an diagnostizierten Fällen die entstehenden Kosten durch finanzielle Einsparungen und gesundheitlichen Nutzen seitens der Betroffenen zu rechtfertigen. Genauere Angaben zu diesem Thema finden sich in Kapitel 5.6.

In der Vergangenheit ging man in Hinblick auf die Häufigkeit von im Screening zu erfassenden Erkrankungen davon aus, dass diese nicht zu selten (öfter als 1:100.000) auftreten sollten (Seidel et al. 2002). Für einige potentiell, mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie erfassbare Erkrankungen, wäre dieses Kriterium nicht oder nur knapp erfüllt. So tritt beispielsweise die Homocystinurie mit einer Häufigkeit von nur ca. 1:150.000 (Liebl et al. 2002) auf, variiert in dieser Hinsicht aber weltweit stark (Yap und Naughten 1998). Für die Tyrosinämie Typ 1 geht man von einem Fall auf 100.000 untersuchte Kinder aus (Liebl et al. 2002, Seidel et al. 2002).

Als in der Vergangenheit die klassischen Kriterien bzw. Ansprüche an das Neugeborenencreening formuliert wurden (Wilson und Junger 1968), arbeitete man allerdings nach dem Prinzip „ein Test = eine Erkrankung“. Die Tandemmassenspektrometrie mit ihren Möglichkeiten hat ein neues Prinzip („ein Test = viele Erkrankungen“) etabliert, dieses sollte wann immer möglich angewandt werden (Levy, 1998).

Wenn es aber möglich ist, seltene Erkrankungen (Häufigkeit $< 1: 100000$) durch eine Screeningmethode ohne Zusatzkosten und Mehraufwand zusammen mit häufigen Erkrankungen zu erfassen, dann verliert der klassische Anspruch an das Neugeborenencreening, nur auf relativ häufige Erkrankungen zu untersuchen, an Bedeutung. Die Entscheidung darüber, ob eine Erkrankung erfasst werden sollte, hängt heute davon ab, inwiefern sie die weiteren Kriterien erfüllt. Die seit dem 01.04.2005 geltenden Screeningrichtlinien, die von zuständigen Bundesausschuss erlassen wurden, verbieten daher beispielsweise die Erfassung des 3-MCC-Mangels oder der Homocystinurie (Anlage A2). Da viele erfassbare Krankheiten sehr selten sind, wird es durch solche strikten Vorschriften

nahezu unmöglich, weitere Informationen hinsichtlich der Früherkennung, der Pathogenität und der Behandlung dieser theoretisch erfassbaren Erkrankungen zu sammeln.

5.2.2 Krankheitswert der erfassbaren Erkrankungen

Für Erkrankungen wie die PKU, den MCAD-Mangel oder die IVA ist das pathologische Potential und damit der Krankheitswert bekannt, und es ist unstrittig, dass gefundene Fälle behandelt werden müssen (Liebl et al 2002). Daher gehören diese Störungen entsprechend der aktuellen Richtlinien (Anlage A2) auch zu den Zielkrankheiten des Neugeborenen Screenings. Bereits bei den konventionellen Screeningverfahren wird neben den eigentlich relevanten, behandlungsbedürftigen Erkrankungen eine gewisse Zahl milder nicht behandlungsbedürftiger Störungen auffällig, so z.B. die HPA, milde Galaktosämien (u.a. die Duarte-Variante) und Fälle von partiellen Biotinidasemangel. Für die durch Tandemmassenspektrometrie erfassbaren Erkrankungen existieren ebenfalls milde Varianten. Einige Erkrankungen, wie z.B. der 3-MCC-Mangel, zeigen ein sehr heterogenes klinisches Erscheinungsbild. Dies kann bedeuten, dass Verwandte (z.B. Mütter) von auffälligen Kindern als positiv für den Mangel identifiziert werden, ohne jemals zuvor Symptome gezeigt zu haben (Koeberl et al. 2003). Andere Betroffene zeigen von Kindheit an eindeutige Symptome (Liebl et al. 2002, Baykal et al. 2005).

Des Weiteren kommen transitorische Erhöhungen vor, die entweder auf einem Anstau des entsprechenden Metaboliten bei Enzymreifungsstörungen oder aber auf der Übertragung von der Mutter auf das Kind beruhen. Die meisten dieser transitorischen Erhöhungen sind nicht behandlungsbedürftig und verursachen keine bleibenden Schäden (Koeberl et al. 2003). Es handelt sich also entweder um symptomlose Fälle im Sinne einer „Non-Disease“ und/oder Erkrankungen, die keinen Krankheitswert in der Neugeborenenperiode besitzen.

Die Diagnose solcher Fälle birgt (wie auch falsch-positive Ergebnisse) bei mangelhafter Aufklärung und Betreuung die Gefahr negativer psychosozialer Auswirkungen (Stigmatisierung, anhaltender Zweifel und Unsicherheit über den Gesundheitszustand des Kindes). Auf der anderen Seite kann die Kenntnis milder Formen, speziell der HPA beim weiblichen Geschlecht, für das spätere Leben wichtig werden. Im Falle einer Schwangerschaft werden so Fruchtschäden vermieden (Liebl et al. 2001).

Im Falle der HPA und bei vergleichbaren Fällen lässt sich argumentieren, dass ein späterer Test mit ausdrücklicher Zustimmung der Personen machbar wäre. Bei anderen Erkrankungen wie dem 3-MCC-Mangel oder dem MCAD-Mangel sind sowohl symptomlose als auch symptomatische Fälle beschrieben (Visser et al. 2000, Koeberl et al. 2003). Auch bei eigentlich symptomlosen Fällen kann aber jederzeit eine negative Entwicklung in Verbindung

mit Infektionen oder Belastungen des Organismus (z.B. Operationen) vorkommen. Ist die Erkrankung bekannt, können präventive Maßnahmen und eine adäquate Behandlung eingeleitet werden. Somit ist durch die Mitteilung der entsprechenden Diagnose potentieller Schaden abwendbar. Jedoch werden, den aktuellen Screeningrichtlinien folgend, Erkrankungen wie die Propionazidämie, die Homocystinurie oder auch der 3-MCC-Mangel nicht mehr erfasst.

5.2.3 Therapiemöglichkeiten

Ein Screeningprogramm sollte nur dann zur Anwendung kommen, wenn die erkannten Erkrankungen erfolgreich behandelbar sind, d.h. das Auftreten von Symptomen vermieden wird oder eine Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden kann (Wilson und Junger 1968; Liebl et al. 2001). Die Diagnose nicht behandelbarer Erkrankungen bringt, dieser These folgend, keine medizinischen Vorteile für die Betroffenen. Das Verhältnis von Aufwand und Nutzen für diese Erkrankungen ist äußerst ungünstig.

Für viele Stoffwechselerkrankungen sind allerdings einfache und preisgünstige Therapien verfügbar. So gilt, dass Prävention von Krisen durch spezielle Ernährung (z.B. phenylalaninarme Diät bei PKU oder kohlenhydratreiche und fettarme Ernährung bei Störungen im Bereich des Carnitinzyklus und der Fettsäureoxidation) entscheidend ist und hilft, bleibende Schäden zu vermeiden (Liebl et al. 2002). Auch die klassische Galaktosämie kann erfolgreich durch galaktosefreie Ernährung therapiert werden (Liebl et al. 2002).

Tatsache ist, dass für nahezu alle im Neugeborenenenscreening erfassbaren Erkrankungen nach erfolgter Diagnose eine spezielle Therapie zur Verfügung gestellt werden kann. Eine Ausnahme bilden dabei nur sehr schwere Varianten einiger Organoazidopathien, Fettsäureoxidationsdefekte oder Harnstoffzyklusdefekte (Pollitt et al. 1997). Neben Unsicherheiten in der Diagnostik kann diese Tatsache auch ein zweiter Grund sein, warum Harnstoffzyklusdefekte nach den aktuell gültigen Screeningrichtlinien (Anhang A2) nicht zu den empfohlenen Zielkrankheiten zählen. Abschließend bleibt festzustellen, dass die gescreenten Erkrankungen im Wesentlichen die Anforderung der „Therapierbarkeit“ erfüllen.

Im Widerspruch zum zuvor Gesagten steht die Tatsache, dass Eltern in der Regel über die Probleme ihres Kindes sobald wie möglich informiert werden wollen (Hall und Michel 1995) und zwar unabhängig von Therapiemöglichkeiten und Prognose. Daher wird unter anderem von Pollitt et al. (1997) die Ansicht vertreten, dass effektive Behandlung keine absolute Grundvoraussetzung für das Neugeborenenenscreening ist. Für betroffene Familien können aus einer frühzeitigen Diagnose Vorteile für die Zukunftsplanung resultieren (z.B. Risikoeinschätzung im Falle weiterer Schwangerschaften) (Pollitt et al. 1997). Durch die

Untersuchung von Familienmitgliedern könnten noch unerkannte Fälle entdeckt werden (z.B. beim 3-MCC-Mangel). Positive Resultate für den 3-MCC-Mangel und weitere Erkrankungen dürfen jedoch nach den aktuellen Richtlinien nicht als auffällig angegeben werden. Deshalb gibt es zukünftig keine Möglichkeit derartige Fälle weiterzuverfolgen.

Ein praktikabler aber schwierig zu realisierender Ansatz zur Lösung dieses Problems wäre die ausführliche Aufklärung der Eltern vor der Screeninguntersuchung. Die betroffenen Personen könnten dann individuell entscheiden, ob auch auf nicht therapierbare oder weitere durch die TMS erfassbare aber nicht in den Screeningrichtlinien enthaltene Erkrankungen untersucht werden soll.

5.3 Effizienz der eingesetzten Screeningverfahren

5.3.1 Fluorometrie oder Tandemmassenspektrometrie zum Screening auf PKU

Die Fluorometrie ist eine exakte quantitative Methode, die in Thüringen zum Screening auf PKU bzw. HPA eingesetzt wurde und während des Beobachtungszeitraums keine falsch negativen Ergebnisse erbrachte. Durch die fluorometrische Methode kann allerdings nur der Screeningparameter Phenylalanin erfasst werden, während durch die Tandemmassenspektrometrie weitere relevante Parameter, wie Tyrosin und die dazugehörigen Verhältnisse (Phe/Tyr-Ratio), bestimmt werden können. Verglichen mit konventionellen Methoden, wie der Fluorometrie, kommen dadurch weniger falsch negative (Chace et al. 1998) bzw. weniger falsch positive Ergebnisse zustande, weshalb die Tandemmassenspektrometrie als exakter gilt. Trotz der hohen Recallrate 2002 (Tabelle 6) kann diese Aussage wohl auch für die Thüringer Daten gelten.

Für vier Jahre und zehn Monate wurde das Screening durch Fluorometrie betrachtet und die daraus resultierenden Zahlen ermittelt (RR: 0,11%; PV: 18%). Für die ersten zwei Monate des Screenings mittels Tandemmassenspektrometrie im Jahre 2001 betrug die RR 0,17%. Für das Jahr 2002 lag sie bei 0,18%, aber nur bei 0,06% im Jahre 2003. Dieser relativ große Unterschied zwischen 2002 und 2003 erklärt sich aus einem viermal größeren Anteil von Kindern mit alleiniger Erhöhung Phe/Tyr-Ratio im Jahre 2002 als im Jahre 2003. Für kein Kind, das eine Erhöhung der Phe/Tyr-Ratio ohne gleichzeitige Erhöhung des Phenylalanins aufwies, konnte die Diagnose PKU bzw. HPA gestellt werden. Dies zeigt, dass die Phe/Tyr-Ratio nur zur Unterscheidung von tatsächlichen PKU- bzw. HPA-Fällen und falsch Positiven oder zur möglichst frühen Unterscheidung zwischen PKU- und HPA-Fällen benutzt werden sollte (Chace et al. 1998, Schulze et al. 1999). Eine alleinige Erhöhung der Phe/Tyr-Ratio, ohne dass zusätzliche Befunde vorliegen, ist aber nicht ausreichend für eine Verdachtsdiagnose. Die Höhe der Phe/Tyr-Ratio in Abhängigkeit von der Diagnose zeigt

Abbildung 11. Für die in diesem Box-Plot-Diagramm dargestellten Gruppen ließ sich nachweisen, dass für $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Die Gruppe „PKU“ unterscheidet sich dabei signifikant von den Gruppen „FP1“ und „FP2“. Die Gruppen PKU und HPA unterschieden sich jedoch nicht signifikant ($p < 0,1$). Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Anzahl von nur drei Patienten in der Gruppe „HPA“ zurückzuführen. Bei Einschluss einer höheren Patientenzahl ließen sich wahrscheinlich Signifikanzen ($p < 0,05$) zu beobachten. Allgemein gilt, dass die Aussagekraft eines statistischen Tests bei einer sehr geringen Fallzahl eingeschränkt ist. Für die in Abbildung 10 dargestellten Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe „PKU“ und „HPA“ bzw. „PKU“ und „FP“.

Es kann festgestellt werden, dass bei Anwendung der Tandemmassenspektrometrie eine deutliche Erhöhung von Phenylalanin, vor allem in Kombination mit einer Erhöhung der Phe/Tyr-Ratio, ein starker Hinweis auf das Vorliegen einer PKU ist. Die zusätzliche Ermittlung der Phe/Tyr-Ratio garantiert laut Ceglarek et al. (2002) eine höhere Sensitivität und Spezifität des Screenings.

Bei den nur für die Phe/Tyr-Ratio auffälligen Patienten „Gruppe FP2“ (Abbildung 11) war die Erhöhung zumeist auf einen relativ niedrigen Tyrosinwert und nur in Einzelfällen auf ein erhöhtes Phenylalanin zurückzuführen. Eine Untersuchung zu diesem Thema wurde von Schulze et al. (1999) an 3.000 gesunden Neugeborenen in Baden-Württemberg durchgeführt. Dabei ergab sich für die Phe/Tyr-Ratio ein Median von 1. Der Cut-Off-Wert wurde so festgelegt, dass er möglichst alle Werte oberhalb der 99,5 Perzentile erfasst. Für die Studie von Schulze et al. (1999) fanden sich unter diesen Voraussetzungen 16 auffällige Kinder. Die erhöhten Werte wurden wie vielfach auch in Thüringen durch zu niedriges Tyrosin verursacht. Da man die Cut-Offs im Neugeborenenenscreeninglabor des Universitätsklinikums Leipzig auf vergleichbare Weise errechnet, sind auch die Ergebnisse vergleichbar. Es wird deutlich, dass es nicht möglich ist, falsch positive Befunde in Bezug auf die Phe/Tyr-Ratio zu vermeiden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine alleinige Erhöhung der Phe/Tyr-Ratio, im Speziellen eine Erhöhung, die nur knapp oberhalb des festgelegten Cut-Offs liegt, ohne zusätzliche Erhöhung des Phenylalaninwertes selbst meist ohne Bedeutung ist.

Werden die durch alleinige Erhöhung der Phe/Tyr-Ratio entstandenen Befunde nicht berücksichtigt, ergibt der mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführte Vergleich zwischen der Fluorometrie und der TMS auch für Thüringen einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Verfahren. Sowohl hinsichtlich der Spezifität als auch hinsichtlich der Sensitivität würde die TMS deutlich bessere Werte aufweisen als die Fluorometrie.

Die Spezifität des PKU-Screenings mittels Tandemmassenspektrometrie wird demnach vor allem durch die exaktere Bestimmung des Phenylalaninwertes und die gemeinsame Betrachtung des Phenylalaninwertes mit dem Wert des Phe/Tyr-Quotienten gegenüber den konventionellen PKU-Screeningverfahren erhöht.

5.3.2 Galaktosämiescreening

Zum Screening der Galaktosämie kamen zwei verschiedenen Verfahren zum Einsatz. Bis zum 10.09.2003 wurde die Gesamtgalaktosekonzentration im Blut bestimmt, ab 11.09.2003 die Aktivität des Enzyms Gal-1-PUT. Die Umstellung des Screenings kam im Rahmen der Einführung der Tandemmassenspektrometrie zustande. Durch die Vorverlegung des Screeningzeitpunktes auf den dritten Lebenstag bestand die Gefahr, dass die Sensitivität des Tests zur Bestimmung der Galaktosekonzentration abnimmt und somit Fälle von klassischer Galaktosämie unerkannt bleiben. Daher wurde dieser Test durch die Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivität ersetzt. Die Sensitivität dieses Tests ist unabhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme. Trotzdem lässt sich eine gewisse Anzahl falsch positiver Ergebnisse nicht vermeiden und stellt ein wichtiges Problem im Bereich des Galaktosescreenings dar (Dobrowolski et al. 2003). Durch eine Kombination der beiden Testverfahren ließ sich im bayrischen Modellprojekt ein merklicher Rückgang der notwendigen Nachkontrollen von 0,17% auf 0,03%, erreichen (Liebl et al. 2001). Derartigen Ergebnissen folgend schreiben die aktuellen Richtlinien zum Neugeborenen Screening (Anhang A2) den Einsatz beider Methoden vor.

In Thüringen betrug die Recallrate für das Screening auf Gesamtgalaktose bis zur Vorverlegung des Screeningzeitpunktes auf den dritten Lebenstag im Oktober 2001 durchschnittlich 0,16%. Ab November 2001 bis zur Umstellung des Screenings auf die Gal-1-PUT-Messung im September 2003 lag die Recallrate nur bei 0,08% (RR für Gesamtgalaktose insgesamt: 0,15%). Obwohl ein Rückgang der Recallrate prinzipiell wünschenswert ist, kann er im hier vorliegenden Zusammenhang ein Hinweis auf eine geringere Empfindlichkeit des Tests unter den geänderten Bedingungen (Vorverlegung des Zeitpunktes der Blutentnahme) sein. Die Umstellung auf das Gal-1-PUT-Screening im Jahre 2003 erscheint insofern sinnvoll. Objektiv betrachtet hatte die Vorverlegung des Screeningzeitpunktes keine negativen Auswirkungen. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass zwischen November 2001 und September 2003 falsch negative Resultate vorkamen.

Die Recallrate, bezogen auf die Untersuchung der Gesamtgalaktose in Trockenblut, lag wie bereits erwähnt bei 0,15% verglichen mit 0,3% für die Untersuchung auf die Gal-1-PUT Aktivität (Tabelle 4). Allerdings ist für das Screening mittels Bestimmung der Gal-1-PUT-

Aktivität der Beobachtungszeitraum von ca. 3 ½ Monaten zu kurz, um eine sichere Aussage über die Sensitivität und Spezifität der Methode treffen zu können. Die ersten, in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena gewonnenen Daten aus dem Jahre 2004 weisen allerdings darauf hin, dass durch die neue Methode mehr milde Varianten bzw. heterozygote Fälle gefunden werden als durch das zuvor angewandte Verfahren. Darauf basierend kann festgestellt werden, dass das Screening auf Gesamthalaktose, verglichen mit der Messung der Gal-1-PUT-Aktivität, prozentual gesehen weniger milde Varianten ermittelt.

Durch das neue Screeningverfahren wurde ausschließlich auf Defekte des Enzyms Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Gal-1-PUT) untersucht. Aktivitätsverminderungen anderer Enzyme des Galaktosestoffwechsels wurden nicht erfasst. Dies sind im Speziellen die Enzyme, die zum Galaktokinase- und Epimerasemangel führen. Ein homozygoter Galaktokinasemangel ist extrem selten und wurde im betrachteten Zeitraum, vor Umstellung des Screenings in Thüringen kein einziges Mal nachgewiesen.

Unter den 21 Galaktosämievarianten, die zwischen 1997 und 2003 auftraten, fand sich ebenfalls keine klassische Galaktosämie auf der Grundlage von zwei schweren Mutationen des Gal-1-PUT-Gens. Da genetisch verschiedene Mutationen eine klassische Galaktosämie verursachen können, kommen auch bei dieser Erkrankung Abstufungen hinsichtlich der Schwere vor. Die Mutation D2 (Duarte-Variante) führt nicht zur klassischen Galaktosämie. Erst kurz nach Ende des Beobachtungszeitraums im Dezember 2003 wurden zwei Fälle von klassischer Galaktosämie diagnostiziert.

Klinisch wurde der bereits unter 4.3.1 erwähnte Patient nach über drei Jahren mit Juvenilem Katarakt auffällig. Durch die spezifische enzymatische Diagnostik wurde die Diagnose einer Compound-Heterozygotie für den Gal-1-PUT- und den Epimerasemangel gestellt. Der Epimerasemangel verläuft häufig asymptomatisch, jedoch gibt es Hinweise, dass bei *Compound-Heterozygotie* für den Transferase- und den Epimerasemangel klinische Symptome, z.B. Katarakt, auftreten können (Liebl et al. 2002, Heyne et al. 1988). Da speziell in dem hier erwähnten Fall das Neugeborenencreening und auch der nach klinischer Diagnose des Katarakts durchgeführte Beutler-Test negativ ausfielen, stellt sich die Frage nach der Diagnostizierbarkeit derartiger Kinder.

Unter den insgesamt 111.845, innerhalb von sieben Jahren untersuchten Neugeborenen wurde nur ein Fall von Epimerasemangel gefunden. Angesichts dieser Tatsachen und Zahlen stellt sich die Frage, ob das Screening auf Epimerasemangel die klassischen Screeningkriterien erfüllt. Wenn dies nicht der Fall ist, ist es unmöglich, diese Unterform der Galaktosämie als Argument für die eine oder die andere Screeningmethode heranzuziehen.

Ein weiteres Kind zeigte bei unauffälligen Screeningwerten bereits in der U1 weiße Punkte in den Augen, wodurch letztlich eine operative Entfernung beider Augenlinsen notwendig wurde. In der Familiengeschichte gab es keine Hinweise auf einen Cataract juveniles. Die bei diesem Kind bestimmten Galaktosewerte lagen im Bereich einer homozygoten Duarte-Variante, eine genetische Untersuchung wurde nicht vorgenommen. Da eine Duarte-Variante für gewöhnlich symptomfrei verläuft, war die Einstufung auf Basis der Messwerte entweder falsch oder die Augenveränderungen basierten nicht auf Veränderungen im Gal-1-PUT-Gen.

Mit Ausnahme dieser beiden Fälle wurden alle Galaktosämievarianten durch das Neugeborenen Screening identifiziert. Über den gesamten Beobachtungszeitraum verteilt traten drei Fälle von persistierender Galaktoseerhöhung auf, die während der ersten Lebensmonate, wegen erhöhter Galaktose-1-P-Werte durch Galaktose-Restriktion (Zwischmilchnahrung: 2/3 Säuglingsnahrung bzw. Stillen; 1/3 Galaktose-freie Nahrung auf Sojamilchbasis) behandelt wurden. Meist wurde bei auffälligem Galaktosämie-Screening keine oder nur vorübergehend eine diätetische Therapie durchgeführt, bis eine endgültige Diagnoseabklärung durch enzymatische Untersuchungen und/oder Genanalyse vorlag. Die diätetische Therapie wurde auch eingestellt, wenn der Galaktosewert bei wiederholter Überprüfung unter Wiedereinführung einer galaktosehaltigen Säuglingsnahrung im Bereich <1 mg/dl lag.

Hinsichtlich des Gal-1-PUT-Mangel kann eine Einteilung in verschiedene genetische Konstellationen vorgenommen werden, wobei neben der Genmutation (G), die bei homozygotem Vorliegen die klassische Galaktosämie verursacht, auch die Mutation (D2) auftritt. Dies ist eine Mutation des Gal-1-PUT-Gens, die sich milder äußert. Tritt sie homozygot, heterozygot oder in Kombination mit der Mutation G auf, sind verschieden stark verminderte Enzymaktivitäten der Gal-1-PUT nachweisbar. Dies veranschaulicht die deutlich erkennbare Gruppierung der Werte in Abbildung 12. Die im linken oberen Quadranten dargestellten Kinder sind *compound-heterozygot* für die Mutationen G und D2. Sie wiesen die geringste Aktivität des Enzyms Gal-1-PUT und die höchste Substratkonzentration auf. Von genetischer Seite ist die Beeinträchtigung bei diesen Kindern stärker, da die Kombination einer schweren und einer milden Mutation vorliegt. Im rechten unteren Quadranten sind die Kinder dargestellt, die heterozygot für die Mutation G waren bzw. homozygot für die Duarte Variante. Von genetischer Seite aus sind die Mutationen bei diesen Kindern weniger schwerwiegend, da entweder eine reinerbig milde Duarte-Variante oder lediglich eine heterozygote Mutation für klassische Galaktosämie und ein Normalallel (N) vorliegt.

Wenn man für diese Kinder die Werte für Gesamtgalaktose aus dem Erstscreening (vor jeder Nahrungsumstellung) mit den Werten der Gal-1-PUT-Aktivität korreliert, lässt sich ein

signifikant negativer Zusammenhang zeigen. Dass dieser nicht deutlicher ausfällt, erklärt sich zum großen Teil aus der geringen Zahl von nur 14 Patienten aber auch aus der Gruppierung infolge unterschiedlicher Genotypen. Trotzdem sprechen die vorliegenden Fakten dafür, dass die Galaktosesubstratbestimmung durch die Messung der Gal-1-PUT-Aktivität ersetzt werden kann. Fujimoto et al. (2000) kommen zu dem Schluss, dass der quantitative Beutler-Test eine klinisch sinnvolle, einfache, automatisierte und sehr zuverlässige Methode für das Neugeborenen Screening auf Galaktosämie darstellt.

Seit dem 01.04.2005 werden infolge des Inkrafttretens der neuen Screeningrichtlinien auch in Thüringen beide Tests (Anhang A2), die Untersuchung auf Gesamtgalaktose und die Gal-1-PUT-Aktivitätsmessung, angewandt. Diese, durch die neuen Screeningrichtlinien fixierte Vorgehensweise erscheint auch vor dem Hintergrund der gewonnen Daten sinnvoll. Positiv ist zum einen, dass durch diese Änderung wieder alle in Thüringen aufgetretenen Varianten der Galaktosämie durch das Screening erfasst werden. Zum anderen sollte auf diese Art und Weise eine Optimierung hinsichtlich Sensitivität und Spezifität ähnlich den Resultaten des bayerischen Modellprojektes möglich werden. Den in Thüringen ermittelten Daten folgend, ist die Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivität zwar hinsichtlich der Sensitivität geeignet die Gesamtgalaktosemessung zu ersetzen, jedoch geben die vorliegenden Daten Hinweise auf Probleme bei der Spezifität. Die hohe Empfindlichkeit der Gal-1-PUT-Messung führt wahrscheinlich dazu, dass erheblich mehr milde Varianten erkannt werden. Die Kombination beider Methoden erscheint geeignet bei der Lösung der Probleme Abhilfe zu schaffen und die Effizienz zu erhöhen (Liebl et al 2001a).

5.3.3 Biotinidascreening

Zum Screening auf den Biotinidasemangel wird nach wie vor eine konventionelle Screeningmethode eingesetzt. Die Erkrankung ist vergleichsweise selten. Innerhalb der sieben betrachteten Jahre wurden sechs Fälle von partiellem Biotinidasemangel auffällig, allerdings kein einziger Fall mit einem kompletten Biotinidasemangel. Bei rund 112.000 in diesem Zeitraum untersuchten Kindern und einer Häufigkeit der Erkrankung von ca. 1:160.000 ist ein solches Ergebnis zumindest nicht ungewöhnlich. Falsch negative Fälle sind nicht bekannt, sodass die Sensitivität des Verfahrens mit eins angegeben werden kann. Die Spezifität beträgt 0,99. Trotz zufriedenstellender Werte im Bereich der Sensitivität und Spezifität liegt der positive Vorhersagewert mit nur 3% vergleichsweise niedrig. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass nur eines von 63 auffälligen Kindern tatsächlich eine Variante des Biotinidasemangels aufwies. Bei den gefundenen Kindern wurde oftmals eine Therapie mit BIO-H-TIN eingeleitet und in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf und der Biotinidase-

aktivität im Serum über das Säuglingsalter hinaus fortgeführt bzw. beendet. Auch wenn der komplette Biotinidasemangel selten ist, besteht im Falle einer rechtzeitigen Diagnose eine ausgezeichnete Prognose und schwere irreversible Symptome (Hör- und Sehverlust) können verhindert werden (Liebl et al. 2002). Die Therapie ist einfach und besteht in der Gabe von Biotin. Obwohl der Biotinidasemangel selten ist, stellt er aus eben genannten Gründen eine interessante Zielerkrankung für das Neugeborenen Screening dar.

5.3.4 Tandemmassenspektrometrie

Die Tandemmassenspektrometrie ist eine Untersuchungsmethode, die voll automatisiert ablaufen kann und den Vorteil einer einfachen Probenaufbereitung besitzt. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass eine tandemmassenspektrometrische Analyse, die zahlreiche einzelne Scans enthält, nur zwei bis drei Minuten (Chace et al. 2003) benötigt. In dieser kurzen Zeit werden alle Metaboliten erfasst, die es ermöglichen, aus einer Trockenblutprobe über 30 Erkrankungen zu erkennen (Chace et al. 2003, Wilcken et al. 2003).

Den aktuellen Screeningrichtlinien folgend (Anhang A2), wird momentan lediglich auf zehn Stoffwechselerkrankungen untersucht. Dennoch ist die Tandemmassenspektrometrie in der Lage, ohne Mehraufwand auch die Informationen über weitere Stoffwechselerkrankungen bereitzustellen. Somit ist es möglich, den Screeningumfang jederzeit zu erweitern.

Was die Sensitivität bzw. Spezifität der Methode betrifft, gehen die bisherigen Studien davon aus, dass die Tandemmassenspektrometrie allen anderen Verfahren weit überlegen ist. So wird im Artikel von Chace et al. (2003) beschrieben, dass für die PKU zehnmal weniger falsch positive Befunde vorkommen als bei jeder anderen Methode. Bartlett et al. (1997) gehen sogar davon aus, in einem Kollektiv von 27.000 Kinder weder falsch positive Ergebnisse noch falsch negative Ergebnisse für irgendeine der gescreenten Störungen erhalten zu haben. Weitere Studien und Artikel der letzten Jahre belegen die offensichtlichen Vorteile der Tandemmassenspektrometrie für das Neugeborenen Screening (Liebl et al. 2001a, Zytkowicz 2001, Chace et al. 2003) und bestätigen, dass diese Methode, unter anderem durch die Bestimmung von Quotienten, bessere Resultate liefert als andere Verfahren.

5.3.5 Aminosäurestoffwechselstörungen

Für die PKU (und HPA) gilt, wie bereits unter 5.3.1 erläutert, dass die Erfassung von positiven Fällen unabhängig von der Methode sehr zuverlässig erfolgt. Die Vorteile der Tandemmassenspektrometrie äußern sich hier vor allem in Hinblick auf die Anzahl der falsch positiven Befunde.

Abgesehen von PKU- und HPA-Fällen wurden in Thüringen in der Gruppe der Aminosäurestoffwechselstörungen nur milde bzw. vorübergehende Erkrankungen beobachtet,

wie z.B. ein Fall von transitorischer Tyrosinämie. Es wurden bei diesem über einen Zeitraum von 1 ½ Monaten wiederholt erhöhte Werte für Tyrosin in Blut und Urin festgestellt und auch im Bereich der Aminosäuren und Acylcarnitine gab es leichtere Verschiebungen. Allgemein scheinen Veränderungen der Menge der Aminosäure Tyrosin in der Neugeborenenperiode häufig zu sein. So verursachten erhöhte Werte für Tyrosin einen erheblichen Anteil der Recalls in der Gruppe der Aminosäurestoffwechselstörungen. Aus diesem Grund gehört das Screening auf Erkrankungen des Tyrosinstoffwechsels nicht zu den aktuell empfohlenen Zielerkrankungen.

Zu niedrige Tyrosinwerte führten über ein erhöhtes Verhältnis von Phenylalanin zu Tyrosin einen Großteil der Recalls wegen Verdacht auf HPA herbei. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Studien von Schulze et al. (1999) und Liebl et al. (2001a). Durch diese und weitere Ergebnisse sowie zunehmende Erfahrung wird es in Zukunft möglich sein, positive Screeningresultate besser zu interpretieren. Dann wird die Miterfassung von Faktoren, wie der Phe/Tyr-Ratio und der Met/Phe-Ratio, die durch die Tandemmassenspektrometrie möglich ist, dazu dienen den positiven Vorhersagewert für die Aminosäurestoffwechselstörungen entscheidend zu verbessern. Wichtig ist dabei, die einzelnen Screeningparameter nicht überzubewerten und die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit zu betrachten.

Es fanden sich des Weiteren mehrere Fälle von milder Homocystinurie (bzw. Hypermethioninämie). Die Homocystinurie (Guilland et al. 2003 sprechen von Hyperhomocysteinämie) führt mit fortschreitendem Alter (oft erst ab dem Schulalter) zu Gefäßschäden (Guilland et al. 2003), dadurch steigt das Risiko Thrombosen und Embolien zu entwickeln (Liebl et al. 2002). Parnetti et al. (2004) kommen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass die Homocystinurie einen Risikofaktor für Schlaganfälle darstellen kann und bei allen Arten von Schlaganfällen routinemäßig bestimmt und gegebenenfalls behandelt werden sollte. Angesichts dieser Tatsache besteht aus wissenschaftlicher Sicht großes Interesse, die Formen dieser Erkrankung zu studieren. Die klassische Homocystinurie ist mit ca. 1:150.000 eine sehr seltene Erkrankung und konnte in Thüringen bisher noch kein einziges Mal nachgewiesen werden. Dass die Tandemmassenspektrometrie die geeignete Methode ist, um diese Störung zu erfassen, bestätigt unter anderem die Studie von Zytkovicz et al. (2001). Die Prognose ist abhängig von der Form der Erkrankung (Vitamin-B6-abhängige Formen haben eine gute Prognose) und von der Güte der Stoffwechseleinstellung. Die Langzeitprognose von Patienten mit frühzeitig begonnener medikamentöser Therapie ist noch nicht bekannt. Leider wird in den aktuellen Screeningrichtlinien (Anhang A2) das Screening auf Homocysteinämie nicht mehr empfohlen. Es muss also bei klinischem Verdacht oder auffälliger Familienanamnese

ein selektives Screening auf Homocysteinämie durchgeführt werden. Dieses umfasst konventionell die Untersuchung der Aminosäuren im Serum und die Bestimmung des Homocysteins im EDTA-Plasma. Alternativ kann auch die Tandemmassenspektrometrie mit Analytik von Trockenblutkarten als primäres selektives Screeningverfahren eingesetzt werden.

5.3.6 Störungen der β -Oxidation und des Carnitinstoffwechsels

Für die Gruppe der Fettsäureoxidation lässt sich, bezogen auf das Thüringer Neugeborenen-screening, eine positive Bilanz ziehen. Nach aktuellem Kenntnisstand wurden alle Fälle erkannt. Wie zu erwarten machte in dieser Gruppe der MCAD-Mangel den größten Anteil aus. Bei insgesamt vier gescreenten Kindern wurde die Diagnose MCAD-Mangel gestellt, für drei dieser Kinder konnte eine Verlaufsbeobachtung durchgeführt werden. Für ein Kind mit einer wahrscheinlich milden Störung wurde die Weiterbehandlung in Leipzig fortgesetzt. Die Recallrate speziell bezogen auf den MCAD-Mangel lag mit 0,03% in einem guten niedrigen Bereich und auch der positive Vorhersagewert erzielte mit 44% ein gutes Resultat (Tabelle 6). Im Bereich der letztlich als falsch positiv eingestuften Screeningbefunde wurden im Rahmen der Konfirmationsdiagnostik tatsächliche Erkrankungen ausgeschlossen. Ähnlich wie bei der PKU (Abbildung 10 und 11) lagen die Werte der falsch Positiven bereits im Erstscreening signifikant niedriger als die der Kinder mit wirklichem MCAD-Mangel (Abbildung 12)

Der MCAD-Mangel tritt in verschiedenen Schweregraden auf (Carpenter et al. 2001). Zschocke et al. (2001) sprechen davon, dass beim MCAD-Mangel die Einteilung in normal und krank verschwommen ist zu einem Spektrum von Enzymmangelstadien, die verursacht werden durch verschiedene Mutationen im ACADM-Gen (= MCAD-Gen; Gen, das die Medium-chain-acyl-CoA-dehydrogenase codiert) und die durch intrazelluläre Vorgänge des Proteinprozessing beeinflusst werden.

Es existieren Fälle, bei denen Patienten ein völlig normales Profil der organischen Säuren im Urin oder auch negative Resultate im Phenylpropionsäure-Belastungstest zeigen. Mutationen, die in solchen Fällen gefunden wurden, sind bereits bei symptomatischen Patienten identifiziert worden. Bei diesen Personen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie während ihres Lebens in problematische Situationen bezüglich ihres Energie- und Glucosestoffwechsels geraten oder unter Carnitinmangel leiden werden (Zschocke et al 2001). Betrachtet man alle vorliegenden Fakten, nimmt der MCAD-Mangel im Neugeborenencreening mittlerweile einen der PKU vergleichbaren Stellenwert (Pandor et al. 2004) ein und kann seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie zuverlässig und früh erkannt werden. Allgemein anerkannt ist die Aussage, dass das Wissen um das Vorliegen eines MCAD-Mangels für Patient, Eltern und Arzt der wesentliche präventive Faktor ist. Die

Eltern wissen darum, Zustände mit prolongiertem Fasten zu vermeiden, um Stoffwechselentgleisungen zu verhindern. Treten diese dennoch z.B. im Rahmen von Infektionskrankheiten ein, wird von den Eltern rasch eine stationäre Behandlung veranlasst und von den Ärzten sofort die „richtige“ Behandlung mit Einleitung einer i.v. Glucose-Infusionstherapie durchgeführt. Damit kann die Mortalität des MCAD-Mangels deutlich herabgesetzt und Residualschäden, bedingt durch unerkannte Stoffwechselkrisen, weitgehend vermieden werden.

Aus dem Spektrum möglicher Störungen wurde, abgesehen vom MCAD-Mangel, nur ein Fall von LCHAD-Mangel nachgewiesen. Die insgesamt niedrige Recallrate in Thüringen und Erfahrungen in anderen Bundesländern (Liebl et al. 2001a) und Ländern deuten jedoch darauf hin, dass eine effiziente Erfassung mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich ist.

Das in Thüringen betroffene Kind war ein Frühgeborenes der 35. SSW, das unter einer peripartalen Asphyxie litt, es kam zu einer Stoffwechseldekompensation in Folge des LCHAD-Mangels. Das Kind litt in den ersten Lebensmonaten unter einer zunehmenden Hepatomegalie.

Fälle von LCHAD oder VLCAD-Mangel können zu plötzlichen Todesfällen führen (Boer et al. 2002, Wood et al. 2001). Daher ist es wichtig, möglichst früh eine eindeutige Diagnose zu stellen, um potentiellen Schaden abzuwenden. Beide Erkrankungen zählen dementsprechend zu den in den aktuellen Richtlinien empfohlenen Zielerkrankungen.

Die Fettsäurestoffwechselstörungen insgesamt wiesen in Thüringen die niedrigsten Recallraten und die höchsten positiven Vorhersagewerte unter den gescreenten Erkrankungsgruppen auf. Die Effizienz des Screenings auf diese Erkrankungsgruppe ist somit höher als beispielsweise die Effizienz des Screenings auf Aminosäurestoffwechselstörungen.

Eine Ausnahme stellt der SCAD-Mangel dar, eine Erkrankung mit sehr variablen Phänotyp (Seidel et al. 2003). Da die Umstände, die zum Ausbruch dieser Erkrankung führen, zu einem großen Teil noch unklar sind und eine effektive Behandlung nicht existiert, wäre eine Einbeziehung dieser Störung im Moment nicht sinnvoll (Pollitt et al. 2001).

Carnitinzyklusdefekte wurden im vorliegenden Zeitraum nicht auffällig. In den Studien von Gempel et al. (1999) und Gempel et al. (2001) konnte jedoch gezeigt werden, dass die Tandemmassenspektrometrie ein sehr spezifisches Acylcarnitinprofil für alle Fälle von CPT 2-Mangel hervorbringt. Der CPT-1-Mangel wird laut einer Untersuchung von Sim et al. (2001) durch erhöhtes freies Carnitin auffällig. In dieser Untersuchung wiesen nur drei von über 140.000 Proben erhöhte Konzentrationen von freiem Carnitin auf. Zwei dieser Kinder litten unter dem CPT-1-Mangel. Die entsprechende Studie weist allerdings auch darauf hin, dass eine alleinige Erhöhung des freien Carnitins nicht beweisend für einen CPT-1-Mangel ist.

Andere Einflussfaktoren, z.B. eine Sepsis, können ebenfalls zu einer Erhöhung des freien Carnitins führen. Nur eines der in Thüringen getesteten Kinder wies im Erstscreening das für einen CPT-1-Mangel typische Profil auf (Tabellen 6 und 7). Die Verdachtsdiagnose konnte im Recall nicht bestätigt werden.

Für alle Fettsäure- bzw. Carnitinstoffwechselstörungen steht bei Bedarf eine wirksame Therapie zur Verfügung. So kann in akuten Situationen die Gabe von Glucoseinfusionen sinnvoll sein, aber auch die Gabe von mittelkettigen Triglyceriden hat sich bewährt (Gillingham et al. 2003, Liebl et al. 2002). Auf lange Sicht sollten Nüchternperioden vermieden werden. Die Ernährung sollte kohlenhydratreich und fettarm sein.

Sowohl der CPT 1-Mangel, der CPT 2-Mangel als auch der Carnitin-Acylcarnitin-Translokasemangel sind sehr seltene Störungen, sodass weitere Beobachtung zu Ausprägung und Häufigkeit notwendig sind. Die Carnitinzyklusdefekte gehören zu den Zielkrankheiten der aktuellen Screeningrichtlinien.

5.3.7 Organoazidopathien

Im Bereich der Organoazidopathien wurde für die empfohlenen Zielerkrankungen IVA und GA Typ 1 kein Fall nachgewiesen. Angesichts der Seltenheit beider Störungen im Bereich von 1:100.000 (Liebl et al. 2002) überrascht dies nicht.

Ein Fall von Propionazidämie wurde auffällig und ein weiterer Fall trat klinisch in der sechsten Lebenswoche durch Trinkschwäche, Lethargie und Ammoniakserhöhung in Erscheinung. Die Ursache für den falsch negativen Befund konnte im Nachhinein überprüft werden. Es handelte sich um einen grenzwertigen, noch Normalbefund.

In einer Erhebung von Sass et al. (2004) wurden 49 bekannte Fälle von PPA betrachtet. Alle diese Fälle wurden durch das Neugeborenencreening auffällig. 86% der in dieser Studie erfassten Kinder litten unter der frühauftretenden Form der Erkrankung (Symptome innerhalb der ersten 90 Lebenstage). Das dem Thüringer Neugeborenencreening entgangene Kind zeigte erste Symptome sechs Lebenswochen nach Umstellung von Muttermilch auf künstliche Säuglingsnahrung. Basierend auf dieser Tatsache und übereinstimmend mit den geltenden Empfehlungen und Richtlinien bestätigt dies, dass das *Erweiterte Neugeborenencreening* auf angeborene Stoffwechslerkrankungen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht in der Lage ist, Fälle von PPA mit hinreichend hoher Sicherheit zu detektieren. Die bisherigen Erfahrungen mit dem Screening auf PPA haben dementsprechend dazu geführt, dass die Erkrankung nicht zum Kreise der empfohlenen Zielerkrankungen gehört (Anhang A2). Angesichts der Schwere der Erkrankung und übereinstimmend mit den Empfehlungen des bayrischen Modellprojektes sollte dies gegebenenfalls überdacht werden.

Für den mittlerweile als häufigste Organoazidopathie (Baumgartner et al. 2001, Liebl et al. 2002) betrachteten 3-MCC-Mangel fanden sich in Thüringen zwei milde Fälle mit wiederholter Erhöhung von 3-HIVA. Bei einem weiteren auffälligen Kind wurde die Erkrankung bei der Mutter nachgewiesen. Die Tatsache, dass auch milde Störungen entdeckt werden, zeigt die hohe Sensitivität der Tandemmassenspektrometrie für die Erkrankung. Im Vergleich mit anderen Erkrankungen bestätigte sich beim 3-MCC-Mangel auch im Zweitscreening häufig der positive Befund. Im Rahmen von wiederholten Kontrollen normalisierten sich die Werte für 3-HIVA unterschiedlich schnell. Die betroffenen Kinder litten lediglich unter einer transitorischen Erhöhung.

Da über den 3-MCC-Mangel, im Speziellen über die Schwere der Symptome, sehr viele unterschiedliche Fallbeschreibungen existieren und die Ursachen für die stark unterschiedlichen Phänotypen nicht geklärt sind, fällt es schwer zu mutmaßen, woher diese Erhöhungen rühren. Eine Möglichkeit, die von Koeberl et al. (2003) beschrieben wird, sind erkrankte Mütter, die erhöhte Metaboliten auf ihre gesunden Kinder übertragen, wie in einem der vorliegenden Fälle nachgewiesen wurde. Für andere Neugeborene mit erhöhter 3-HIVA müssen weitere Erklärungsmöglichkeiten gefunden werden, da das Vorliegen von maternalem 3-MCC-Mangel in vielen Fällen ausgeschlossen werden konnte. Was den Nutzen im Sinne einer Therapie betrifft, gehen Koeberl et al. (2003) davon aus, dass die Morbidität und Mortalität des 3-MCC-Mangels auf ein Minimum reduziert werden können, wenn eine frühzeitige Diagnose und eine adäquate Behandlung erfolgen. Die Toleranz einiger Individuen bezüglich des 3-MCC-Mangels ist schwierig zu erklären, da die Pathogenese dieser Erkrankung noch nicht vollkommen verstanden ist (Visser et al. 2000).

Infolge der vorliegenden Fakten wurde der 3-MCC-Mangel nicht in den Kreis der empfohlenen Zielerkrankungen aufgenommen. Stärker als bei anderen Stoffwechselstörungen, zeigt sich beim 3-MCC-Mangel ein heterogener Phänotyp. Dennoch kann man basierend darauf, dass die Letalität bei 8% liegt und eine durchschnittliche Erstmanifestation zwischen dem ersten Lebenstag und einem Alter von 4,7 Jahren (Liebl et al. 2002) eintritt, für ein Screening auf den 3-MCC-Mangel plädieren. Laut Liebl et al. (2002) bleiben nur 30% der Betroffenen völlig symptomfrei. Die Tandemmassenspektrometrie könnte in Zukunft einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, die Erkrankung früh zu erkennen bzw. dazu dienen mehr über diese Erkrankung herauszufinden.

5.3.8 Harnstoffzyklusdefekte

Die Screeningrichtlinien empfehlen zum jetzigen Zeitpunkt keine Erkrankung aus dieser Gruppe ausdrücklich als Zielerkrankung. Die Ursache liegt in mangelnder Sensitivität und

Spezifität der Screeninguntersuchungen, Unsicherheiten bei der Konfirmationsdiagnostik und der Nachsorge (Liebl et al. 2001a).

Dennoch wurden die für diese Krankheitsgruppe relevante Parameter im Thüringer Neugeborenen Screening erfasst. Besonders häufig zeigte sich dabei eine Erhöhung der Aminosäure Citrullin (vor allem im Jahre 2003 mit einer Recallrate von 0,23%). Eventuell ist die Ursache für die hohe Anzahl an falsch positiven Befunden im Verfahren zu finden, dann würde mit zunehmenden Erfahrungen und Anzahl der untersuchten Proben die Anzahl falsch positiver Befunde zurückgehen. Möglicherweise waren aber auch im Nachhinein nicht mehr nachvollziehbare Probleme im Bereich der Präanalytik von Bedeutung.

Neben den für Citrullin auffälligen Befunden traten vor allem Argininerhöhungen in Erscheinung. Allerdings wurde auch hier im relevanten Zeitraum keine Erkrankung gefunden, jedoch 2004 ein Fall von Argininbernsteinsäureerkrankung diagnostiziert und bestätigt.

Trotz bekannter Probleme bei der Diagnostik und Therapie gehen Sander et al. (2003) davon aus, dass für die Citrullinämie sowohl symptomatische als auch asymptomatische Patienten von einer frühen Diagnose profitieren würden. Sander et al. (2003) empfehlen daher dies in einer klinischen Studie zu untersuchen. Im selben Artikel schreiben die Autoren, dass die erfolgreiche Behandlung einiger schwerer Fälle das Screening aller Neugeborenen in Form eines Pilotprojektes rechtfertigen kann. Dabei müsste akzeptiert werden, dass relevante Kriterien, z.B. Höhe der Sensitivität und Spezifität, noch nicht ausreichend erforscht sind.

Die Schwere der Symptome und die Häufigkeit der Erkrankungen im Bereich des Harnstoffzyklus (kumulative Inzidenz laut Zschocke und Hoffmann (2002) 1:20.000) sowie das mitunter sehr frühe Einsetzen der Symptome (ab dem zweiten Lebenstag) sollten jedoch Anlass für die weitere Erforschung dieser Erkrankungen sein. Nur so können die Möglichkeiten des Neugeborenen Screening durch Tandemmassenspektrometrie in diesem Bereich voll ausgeschöpft werden.

5.3.9 Fälle von sekundärem Carnitinmangel

Dreizehn Fälle von „sekundärem Carnitinmangel“ wurden im ersten Halbjahr nach Einführung der Tandemmassenspektrometrie beobachtet. Sofern die Folgediagnostik einen erniedrigten Carnitinwert bestätigte, wurden diese Fälle zeitweise durch L-Carnitin-Substitution behandelt. Eine spezifische Stoffwechselstörung im Bereich der Synthese und des Transports von Carnitin wurde während des beobachteten Untersuchungszeitraums nicht nachgewiesen.

Ein Mangel an freiem Carnitin (C0) wurde bereits in Studien wie dem bayerischen Modellprojekt beobachtet. Besonders bei Frühgeborenen oder infolge von parenteraler

Ernährung bei Reifgeborenen tritt ein solcher Mangel vermeintlich häufig auf (Seidel et al. 2002). Besondere Beachtung verdient der Wert für freies Carnitin, vor allem im Zusammenhang mit dem Wert für Acylcarnitin, bei der Diagnostik von angeborenen Stoffwechselstörungen. So ist das Verhältnis der Acylcarnitine zum freien Carnitin (AC/C0-Ratio) oftmals im Falle von Erkrankungen im Bereich der Fettsäureoxidation, bei mitochondrialen Erkrankungen und bei Organoazidopathien erhöht (Chace et al. 2003a).

Erniedrigtes, freies Carnitin sollte abgeklärt werden, ist aber, wie die Erfahrungen in Thüringen oder auch Bayern zeigen, als alleiniger auffälliger Wert nicht zur Diagnostik von Stoffwechselstörungen geeignet. Die Therapie eines sekundären Carnitinmangels ist nur in Einzelfällen angezeigt. Ein alleiniger „Mangel“ an Carnitin gehört deshalb nicht in den Bereich der Zielerkrankungen.

5.4 Differentialdiagnosen zur Sicherung des Befundes/ Konfirmationsdiagnostik

Nach erstmaliger Feststellung erhöhter Werte erfolgt ein Zweitscreening. Werden auch bei diesem erhöhte Werte nachgewiesen oder war das Erstscreening überdurchschnittlich stark positiv, folgt die Konfirmationsdiagnostik, um möglichst bald mit einer effizienten Therapie beginnen zu können. Dazu steht unter anderem die Untersuchung von Blut auf die entsprechenden Aminosäuren, Fette, Ketonkörper, Leberenzyme, Pyruvat, Laktat, Ammoniak und viele weitere Stoffe zu Verfügung. Besondere Bedeutung hat die Untersuchung des Urins auf organische Säuren.

Im Falle von MCAD-Mangel lassen sich oftmals Adipat, Suberat und Sebacinat nachweisen, die z.B bei den für die Mutation K329E homozygoten Patienten gefunden wurden. Beobachtet werden aber auch Octandisäure, Octendisäure und Decendisäure. Typisch sind weiterhin 5-Hydroxyhexanoat, Hexanoglycin und Suberylglycin, die nicht nur in homozygoten MCAD-Mangel-Patienten, sondern auch in dem Falle der Compound-Heterozygotie für die Mutationen K329E/Y42C nachweisbar waren. Wie am Beispiel des MCAD-Mangels beschrieben, existieren für alle Erkrankungen typische Metabolitenmuster, die in Blut und Urin nachweisbar und bei der Diagnosesicherung hilfreich sind.

Für viele Erkrankungen sind die verursachenden Mutationen bekannt, sodass als sicherstes Mittel der Diagnostik und eventuell auch für die Zuordnung des Schweregrades der Erkrankung, z.B. Duarte-Varianten bei Galaktosämie, die Genanalyse zur Verfügung steht. Des Weiteren stehen verschiedene Methoden der apparativen Diagnostik zur Verfügung, um mögliche organische oder neurologische Defizite abzuklären.

Alle genannten diagnostischen Maßnahmen verursachen Kosten. Die Abklärung einer Erkrankung kann Eltern und deren Einstellung gegenüber dem Gesundheitszustand ihres

Kindes (Liebl et al. 2001, Pollitt et al. 2001) massiv beeinflussen. Deswegen ist es sowohl in Hinsicht auf die Effizienz des Neugeborenen Screenings als auch aus ethischen Erwägungen notwendig, die Spezifität des Verfahrens immer weiter zu verbessern und so die Anzahl der falsch positiven Befunde zu minimieren.

5.5 Der Einfluss des Gestationsalters auf das Screening durch TMS

Wie in Abbildung 16 dargestellt, ist der Anteil an frühgeborenen Kindern in der Gruppe der durch die Tandemmassenspektrometrie auffällig gewordenen Kinder erheblich höher als in der Normalbevölkerung. Der Anteil an auffälligen Kindern, die vor der 32. SSW geboren wurden, lag mit 13,3% aller auffälligen Kinder weit oberhalb des Anteils dieser Kinder in der Normalbevölkerung. Zum Vergleich existieren meist nur Statistiken, die sich auf das Geburtsgewicht beziehen. Stauber und Weyerstahl (2001) geben den Anteil von Geburten vor der abgeschlossenen 37. SSW mit 6% und den Anteil an Kindern, die ein Geburtsgewicht <1500g (entspricht in etwa der 32. SSW) aufwiesen, mit ca. 1% an.

Ein erhöhter Anteil von Frühgeborenen in Screeningprogrammen ist ein Problem, das in der Literatur wiederholt angesprochen wurde. Zabransky (2001) wies auf eine erhöhte Rückrufrate bei frühgeborenen Kindern hin, die auf das AGS getestet worden.

Zytokovicz et al. (2001) gehen in ihrer Analyse des Neugeborenen Screenings durch Tandemmassenspektrometrie auf Aminosäurestoffwechselstörungen, Fettsäurestoffwechselstörungen und Organoacidopathien davon aus, dass ca. die Hälfte der in ihrer Studie auffälligen Kinder ein zu geringes Geburtsgewicht (< 1500g) aufwiesen bzw. nach der Geburt eine intensivmedizinische Betreuung benötigten.

Obwohl nicht für alle in Thüringen auffälligen Kinder nachträglich die Schwangerschaftswoche der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt belegbar ist, zeigen Abbildung 16, 17, 18 und 19 sowie Tabelle 13, dass die Frühgeburtslichkeit nicht auf jeden der messbaren Screeningparameter einen gleichgroßen Einfluss ausübt. So ließ sich in Thüringen für 61% der für erhöhtes Tyrosin auffälligen Kinder ein zu früher Geburtstermin, vor Abschluss der 37. SSW, nachweisen, ca. 1/3 dieser Frühgeborenen (22% aller für Tyrosin auffälligen) waren Frühgeborene vor der 32. SSW. Im starken Kontrast dazu standen in Thüringen die auffälligen Kinder mit erhöhten Citrullinwerten. Nur zwei der auffälligen Kinder waren Frühgeborene. Dies deutet entweder darauf hin, dass bezüglich von Citrullinerhöhungen das Gestationsalter nur eine untergeordnete Rolle spielt oder aber darauf, dass in unserem Fall die Ursache für die vielen erhöhten Citrullinwerte im Verfahren bzw. im Bereich der Präanalytik zu suchen ist. In einer Studie von Zytokovicz et al. (2001) waren 35% der für Citrullin auffälligen Kinder Frühgeborene bzw. intensivtherapiepflichtige Kinder. Basierend auf

derartigen Resultaten kann angenommen werden, dass die in Thüringen für Citrullin auffälligen Befunde aus Verfahrens- oder Präanalytikproblemen resultierten. Ob und inwieweit die Frühgeburtlichkeit für Erhöhungen des Citrullins mitverantwortlich ist, muss in weiteren Beobachtungen geklärt werden. Wie Abbildung 19 zeigt, existiert mit Arginin ein Metabolit des Harnstoffzyklus, der insbesondere bei Frühgeborenen erhöht war. Besonders stark waren in Bezug auf erhöhtes Arginin die Kinder vertreten, die vor der 32. SSW geboren wurden.

Häufig waren auch dann Frühgeborene im Spiel, wenn unspezifische Erhöhungen der Aminosäuren oder der Acylcarnitine auftraten. Es erscheint logisch, dass Verschiebungen im metabolischen Bereich, z.B. aufgrund von Enzymunreife, vor allem bei unreifen Neugeborenen vorkommen (Zytokovicz et al. 2001). Daher schreiben die aktuellen Screeningrichtlinien (Anhang A2) in Deutschland vor, dass Kinder, die vor der 32. SSW geboren wurden, ein zweites Mal im „korrigierten“ Alter von 32 Wochen untersucht werden. Am Beispiel des Tyrosins (Abbildung 20) lässt sich zeigen, dass auch die Höhe der im Screening gemessenen Werte mit dem Alter bei der Geburt in Zusammenhang stehen kann. Die Gruppe der Kinder, die vor der 32. SSW geboren wurden, weist signifikant höhere Tyrosinwerte auf als die Gruppe der zwischen der 32. und der 37. SSW Geborenen bzw. die Gruppe der reifgeborenen Kinder. Zwischen den entsprechenden Gruppen der für Arginin auffälligen Kinder fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Zytokovicz et al. (2001) stellen fest, dass die Population der Kinder mit geringem Geburtsgewicht (und damit auch viele Frühgeborene) und der Kinder, die einer intensivmedizinischen Betreuung bedürfen, eine Herausforderung für die Screeninglaboratorien darstellen. Dies liegt daran, dass sich die Marker-Profile von Frühgeborenen und Reifgeborenen oftmals deutlich unterscheiden.

In Thüringen war aufgrund der vorhandenen Daten nur eine Betrachtung des Geburtszeitpunktes und nicht des Geburtsgewichtes der auffälligen Kinder möglich. Hinsichtlich des Geburtszeitpunktes zeigte sich deutlich, dass die Gruppe der Frühgeborenen innerhalb der Gruppe der durch Tandemmassenspektrometrie gescreenten Kinder problematisch oft auffällig wurde. Die Frage, inwieweit das Geburtsgewicht oder gesundheitliche Beeinträchtigungen zum Geburtszeitpunkt das Screeningergebnis beeinflussen, muss in Zukunft weiter erforscht werden, um die Zahl falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren.

Beachten sollte man, dass auch Frühgeborene unter metabolischen Erkrankungen leiden können. Daher sollten auffällige Befunde bei Frühgeborenen einerseits mit Vorsicht und Sorgfalt betrachtet, andererseits aber unbedingt ernst genommen werden.

5.6 Kosten-Nutzen-Verhältnis

Genaue Angaben zu den durch das Neugeborenencreening anfallenden Kosten und den durch frühzeitige Diagnostik eingesparten Geldern sind nur schwierig zu erhalten, da bis zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr wenige Zahlen veröffentlicht wurden.

In Thüringen geht man in etwa von 11 Euro (inklusive TSH und AGS-Screening) für Probenabnahme, Probenversand und Labordiagnostik aus. Verhees (1999) sprach von 20 DM (ca. 10 Euro) Zusatzkosten pro TMS-Screening.

Wenn man durchschnittlich 16.000 Erstscreeninguntersuchungen für Thüringen annimmt, müssten also 176.000 Euro pro Jahr aufgebracht werden. Für einen Zeitraum von fünf Jahren ergeben sich somit ca. 880.000 Euro, die in die Durchführung des Screenings investiert werden.

Um eine sichere und schlüssige Aussage über das Kosten-Nutzen-Verhältnis zu treffen, müssen aber noch mehr Faktoren berücksichtigt werden. Schoen et al. (2002) empfehlen dabei folgende Punkte einzubeziehen: Ausrüstung und Material, Personal, Probenabnahme, Transport der Proben, Durchführung des Tests, Ergebnismitteilung, „Tracking“ erforderliche Nachkontrollen (z.B. bei falsch positiven Ergebnis), Beratung der betroffenen Personen, Behandlung und Langzeitbeobachtung. Berücksichtigt man alle diese Punkte, so erhält man die Gesamtkosten, die durch das Neugeborenencreening anfallen.

Demgegenüber stehen die Kosten, die durch frühzeitige Diagnostik eingespart werden können. Einsparungen sind z.B. möglich, wenn bei bekannter Diagnose eine Stoffwechselkrise vermieden werden kann. Die durch die Krise entstehenden Krankenhauskosten werden vermieden. Eine akute Krise infolge einer angeborenen Stoffwechselstörung beinhaltet oftmals auch das Risiko bleibender Schäden, vor allem im neurologischen Bereich. Bleibende Schäden führen wiederum zu Diagnostik und lebenslang notwendiger Therapie oder unterstützender medizinischer und sozialer Betreuung (Bartlett et al. 1997, Tokatli et al. 1998, Liebl et al. 2002).

Für die PKU-Erkrankung existieren die meisten Erfahrungen. Auf diesen basierend schätzt man die lebenslang notwendig werdenden Behandlungs- Unterbringungs- und Pflegekosten auf ca. 1,5 Millionen Euro pro Fall. Ein Großteil dieser Kosten kann bei rechtzeitiger Diagnostik eingespart werden, da bei entsprechender Behandlung Unterbringungs- und vor

allem auch Pflegekosten entfallen. Aufgewendet werden müssen in jedem Fall die Kosten für eine phenylalaninarme Diät, langfristige Beobachtung und Kontrollen.

Die Tandemmassenspektrometrie vermag die für ein Neugeborenencreening auf PKU anfallenden Kosten nur im Punkt der Kontrollen durch falsch positive Befunde wesentlich zu senken, da hier wiederholt nachgewiesen werden konnte, dass durch die Tandemmassenspektrometrie weniger falsch positive Befunde auftreten als in anderen Screeningverfahren (Chace et al. 1998, Levy 1998). Eine Studie von Pollitt et al. (2001) kommt in Hinblick auf die Kosten-Nutzen-Frage zu dem Schluss, dass eine Umstellung des PKU-Screenings auf die Tandemmassenspektrometrie nur dann durchgeführt werden sollte, wenn gleichzeitig eine Ausweitung des Screeningprogramms geplant ist. Dann allerdings geht man in derselben Studie von einem sehr guten Kosten-Nutzen-Verhältnis aus. Pandor et al. (2004) bestätigen dies insoweit, als man auch hier zu dem Schluss kommt, dass ein kombiniertes Screening auf PKU und MCAD-Mangel finanziell effektiv wäre.

Da im Moment auf Grund fehlender Erfahrungen mit dem Neugeborenencreening durch Tandemmassenspektrometrie in Thüringen noch keine exakten Zahlen vorliegen, wird im Weiteren auf Ergebnisse aus der Literatur Bezug genommen.

Schoen et al. (2002) haben in den USA eine Betrachtung zu Kosten und Nutzen der Tandemmassenspektrometrie durchgeführt und kamen zu dem Ergebnis, dass die meisten Kosten bei frühzeitiger Diagnose während der ersten fünf Lebensjahre eingespart werden können. Die Höhe der eingesparten Kosten, bezogen auf fünf Jahre und Kinder, die unter fünf Jahre alt sind, beträgt ca. 30.000 Dollar im Falle der PPA, der MMA, verschiedener Harnstoffzyklusdefekte, der Homocystinurie oder der GA 1. Im Falle einer MSUD können sogar bis zu 55.000 Dollar eingespart werden.

In Bezug auf den MCAD-Mangel kam man in den Studien von Insinga et al. (2002) und Venditti et al. (2003) zu dem Ergebnis, dass durch das Neugeborenencreening die Mortalität und die Morbidität für diese Erkrankung gesenkt werden können. Die abfallenden Kosten wurden in diesen Fällen als „akzeptabel“ eingestuft. Venditti et al. (2002) gehen dabei davon aus, dass bezogen auf einen Zeitraum von 70 Jahren alle entstehenden Kosten durch vermiedenen Schaden ausgeglichen werden und dass auch dann, wenn keine anderen Erkrankungen in das Screening durch Tandemmassenspektrometrie einbezogen werden.

Schoen et al. (2002) kommen zu dem Schluss, dass die Tandemmassenspektrometrie verglichen mit anderen akzeptierten Screeningverfahren, wie dem Screening auf Prostata- oder Brustkrebs, aus finanzieller Sicht positiv bewertet werden kann. Wichtig sind in diesem

Zusammenhang die Häufigkeiten der untersuchten Erkrankungen, aber auch die Anzahl der falsch positiven Screeningergebnisse.

In Thüringen lag das Verhältnis von richtig positiven zu falsch positiven Tests bezogen auf die Tandemmassenspektrometrie in den Jahren 2002 und 2003 bei 1:13. Auf der Seite der richtig positiven Befunde sind dabei auch milde, nicht behandlungsbedürftige Kinder erfasst. Ziel sollte es sein, dieses Verhältnis in Zukunft zu senken und so einen positiven Effekt auf der Kostenseite zu erzielen.

Betrachtet man die vorliegenden Fakten, kann man feststellen, dass es durch die Tandemmassenspektrometrie möglich wurde, das Neugeborenen Screening auf eine größere Zahl von Erkrankungen zu erweitern. Die Einführung der neuen Methode ging mit erhöhten Kosten einher. Die Kosten für das Screening der PKU durch Fluorometrie gingen in der Tandemmassenspektrometrie auf. Durch langfristig weniger falsch positive Befunde und noch frühere und genauere Erkenntnisse über PKU bzw. HPA können Kosten eingespart und ein Teil der Mehrkosten durch die Tandemmassenspektrometrie aufgefangen werden.

Es werden nun Erkrankungen wie der MCAD-Mangel oder die MSUD erkannt, die besonders in den ersten Lebensjahren hohe Kosten durch Stoffwechselkrisen verursachen. Bei bekannter Diagnose kann ein Großteil dieser Krisen verhindert und so Kosten für stationäre Behandlung und Diagnostik eingespart werden.

Vorsichtigen Schätzungen in Bezug auf die Kosten von nicht rechtzeitig erkannten MCAD-Mangelfällen, bei denen ca. 5 bis 6 Stoffwechselkrisen auftraten, neurologische Defizite zurückblieben, stationäre Behandlungen notwendig wurden, apparative Diagnostik des ZNS durchgeführt wurde und neurologische, psychotherapeutische und sozialtherapeutische Betreuung notwendig war, gehen davon aus, dass für einen solchen Fall mindestens 100.000 Euro ausgegeben werden müssen. Liebl et al. (2002) geben an, dass ca. 40% aller MCAD Fälle einen solchen Verlauf mit neurologischem Schaden nehmen.

Innerhalb des Zeitraums von zwei Jahre und zwei Monaten wurden in Thüringen vier Fälle von MCAD-Mangel gefunden. Bezogen auf die Zahl der untersuchten Kinder ergibt sich eine Häufigkeit von ca. 1:8.000. Die langfristige Therapie erkannter Fälle besteht im Wesentlichen in einer fettarmen und kohlenhydratreichen Ernährung und dem Vermeiden von Fastenepisoden (Pollitt und Leonard 1998, Liebl et al 2002). Sie ist somit extrem kostengünstig.

Ein einziger Fall von LCHAD-Mangel wurde in Thüringen gefunden (Häufigkeit bezogen auf den relevanten Zeitraum 1:30.000). Da Kinder mit Erkrankungen des Abbaus der langkettigen Fettsäuren im Allgemeinen ein schwereres klinisches Krankheitsbild aufweisen als der

MCAD-Mangel, dürften auch die erforderlichen Behandlungskosten den MCAD-Mangel übertreffen. Somit könnten potentiell mehr Kosten eingespart werden. Im Bereich rechtzeitig erkannter Organoazidopathien wie der IVA oder der PPA sind ebenfalls Einsparungen möglich.

Wie hoch die Kosten für die Diagnostik und Kontrolle milder Störungen sind, sollte in Zukunft genauer betrachtet werden. Für diese Erkrankungen sind Einsparungen in Bezug auf spätere Krisen vergleichsweise unwahrscheinlich.

Abgesehen von direkten Einsparungen, die auf Seite der Behandlungskosten entstehen, wird bei rechtzeitiger Therapie sowohl den Betroffenen selbst als auch Angehörigen ein produktiveres und zufriedeneres Leben ermöglicht. Arbeitsausfälle seitens der Angehörigen, die Pflegemaßnahmen übernehmen müssten, werden vermieden.

Außer finanziellen Vorteilen finden sich auf der Nutzenseite auch die gewonnenen Lebensjahre als medizinischer und moralischer Wert. Zusätzliche Lebensjahre bedeuten allerdings gleichzeitig einen längeren kostenpflichtigen Behandlungszeitraum.

Durch eine frühe Diagnose der entsprechenden Stoffwechselerkrankungen verbessert sich für die Patienten sowohl die Lebenserwartung als auch die Lebensqualität. Schoen et al. (2002) gehen dabei davon aus, dass für viele Erkrankungen die Lebenserwartung durch rechtzeitige Diagnostik um ca. 20 Jahre angehoben werden kann. Ziel muss es sein, die entsprechenden Erkrankungen so früh wie nur möglich zu erkennen und dadurch nicht nur die Lebenserwartung, sondern auch die Lebensqualität zu verbessern. Die pro Lebensjahr anfallenden Behandlungskosten können so möglichst niedrig gehalten werden.

5.7 Ethische Fragen und Probleme des Neugeborenencreenings

Viele der in Zusammenhang mit dem Neugeborenencreening auftretenden ethischen Fragen wurden bereits in den vorangegangenen Abschnitten angesprochen, so z.B. die Frage nach der Miterfassung milder, nicht therapiebedürftiger Störungen oder die Problematik der Behandlung.

Das Neugeborenencreening auf angeborene Stoffwechselerkrankungen und Endokrinoopathien ist eine der bedeutendsten Errungenschaften der Präventivmedizin (Liebl et al. 2001). Es hat sich als gesundheitliche Vorsorgemaßnahme für verschiedene Erkrankungen bewährt und ist stark verbreitet. Aufgrund guter Resultate und Erfahrungen wird von verschiedenen Seiten angestrebt, den Umfang des Neugeborenencreenings mehr und mehr zu erweitern um möglichst viele angeborene Erkrankungen zu erfassen. Der größte und bedeutendste Schritt in dieser Richtung war die Einführung der Tandemmassenspektrometrie.

Man darf, wie Liebl et al. (2001) feststellen, allerdings nicht außer Acht lassen, dass es sich beim Neugeborenen Screening um ein Bevölkerungsscreening handelt, indem die gesamte Population **gesunder** Neugeborener erfasst wird und zwar ohne Rücksicht auf das Vorliegen klinischer Symptome oder eines erhöhten Risikos für die jeweiligen Erkrankungen. Für jede Erkrankung, auf die ein Screening prinzipiell möglich ist, sollte also sorgfältig geprüft werden, ob sie die festgelegten Screeningkriterien erfüllt.

Aus den Gegebenheiten, unter denen das Neugeborenen Screening stattfindet, kann man auch die Verantwortung ableiten, die mit der Durchführung eines solchen Programms einhergeht. Nicht nur Familien und Ärzte haben Interesse an den Ergebnissen eines Neugeborenen Screenings, sondern auch Industrie, Krankenkassen, pharmazeutische Industrie oder Wissenschaft und Forschung (Haverkamp et al. 2001). Die durch das Neugeborenen Screening gewonnenen Daten können durch Dritte in einer Art und Weise genutzt werden, die in eindeutigem Gegensatz zu dem beabsichtigten Nutzen für die Betroffenen steht. An dieser Stelle ist es notwendig, einen ausreichenden Datenschutz sicherzustellen.

Die Mitteilung eines positiven Screeningergebnisses kann bei den betroffenen Eltern zu starken psychischen und somatoformen Reaktionen führen. Auch für die Familien entstehen enorme Belastungen (Müller-Sinik und Haverkamp 2001). Diese Reaktionen können sowohl im Falle eines richtig positiven wie auch im Falle eines falsch positiven Befundes auftreten. Wenn Kinder letztlich als gesund befunden werden, kann bei den Eltern eine gewisse Restunsicherheit bestehen und zu einem veränderten Umgang mit dem Kind führen (Müller-Sinik und Haverkamp 2001, Pollitt et al. 2001). Aus diesem Grunde ist es wichtig, falsch positive Befunde soweit wie möglich zu reduzieren. Des Weiteren ist es wichtig, alle Eltern möglichst schon vor der Geburt des Kindes ausführlich über Sinn und Ablauf des Neugeborenen Screenings aufzuklären und klar zu machen, dass ein positiver Befund nicht notwendigerweise mit einer Erkrankung gleichzusetzen ist.

Es sollte stets erläutert werden, dass erst Nachuntersuchungen sicheren Aufschluss darüber geben können, worin die Ursachen eines falsch positiven Befundes liegen, denn für viele Eltern ist es schwer verständlich, wenn sich ein zuvor positives Testergebnis innerhalb weniger Tage als falsch herausstellt (Müller-Sinik und Haverkamp 2001). Es sollte also in jedem Falle eine ausführliche Aufklärung der Eltern hinsichtlich der durch das Screening gewonnen Ergebnisse und der sich ergebenden Konsequenzen erfolgen. In Thüringen standen und stehen entsprechende Aufklärungsbögen der durchführenden Screeninglaboratorien zur Verfügung, die flächendeckend Anwendung finden.

5.8 Sensitivität und Spezifität der Verfahren

Ziel der Tandemmassenspektrometrie ist es, noch früher und mit größerer Sicherheit als bei den konventionellen Methoden alle erkrankten Kinder zu erkennen. Die Vorteile der Methode liegen in der Schnelligkeit der Analyse und im hohen Informationsgehalt durch die Möglichkeit, mehrere Metabolite aus einer Trockenblutprobe zu messen (Morgenthaler 2004). So kann beispielsweise eine Erkrankung wie die PKU nicht nur durch erhöhtes Phenylalanin, sondern auch durch das erhöhte Verhältnis von Phenylalanin zu Tyrosin bestimmt werden (Seidel et al. 2002). Weitere wichtige Quotienten sind der Fisher-Quotient oder das Verhältnis von Methionin zu Phenylalanin (Morgenthaler 2004). Die Gesamtheit aller Informationen aus der Analyse einer Trockenblutprobe soll eine im Vergleich zu anderen existierenden Methoden höchste Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität ermöglichen. Liebl et al. (2002) haben das Problem der Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Screeningparameter besprochen. Soweit keine anderen Autoren genannt werden, beziehen sich die folgenden Angaben auf diese Quelle.

Im Falle des Phenylalanins können demnach Leberunreife, Hyperalimentation, Aminosäureinfusionen, Verunreinigungen der Testkarte mit Nahrungsmitteln, Exkreten oder aspartamhaltigen Lösungen in sehr seltenen Fällen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Meist besteht dann jedoch ein normales Verhältnis von Phenylalanin zu Tyrosin. Dialyse und Bluttransfusionen können zu einer Senkung des Phenylalaninspiegels und zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Auch im Falle von Tyrosin ist zu beachten, dass die Konzentration im Blut von der Proteinzufuhr mit der Nahrung abhängt. Unspezifisch erhöhte Tyrosinkonzentrationen (falsch Positive) können vielerlei Ursachen haben, darunter Aminosäureinfusionen, schwere allgemeine Lebererkrankungen oder Wärmeexposition der Proben (Proteolyse). Die Betrachtung zusätzliche Parameter aus den massenspektrometrisch gewonnenen Aminosäuremustern ermöglicht es, diese Fehlerquellen zu erkennen. Nicht alle Formen der Tyrosinämie manifestieren sich bereits kurz nach der Geburt, was eine Ursache für falsch negative Resultate darstellt. Vergleichbares gilt auch für erhöhte Methioninkonzentrationen. In den meisten Fällen handelt sich um unspezifische Erhöhungen infolge eines noch nicht ausgereiften Enzymsystems oder Hyperalimentation.

Die verzweigtkettigen Aminosäuren im Blut steigen unmittelbar nach der Geburt an. Signifikante Anstiege, die auf eine MSUD hinweisen, benötigen eine Proteinzufuhr mit der Nahrung bzw. einen Katabolismus. Deshalb besteht besonders bei milden Formen und bei zu früher Probenentnahme die Gefahr falsch negativer Screeningbefunde. Umgekehrt kann auch

hier die Unreife eiweißabbauender Enzymsysteme zu falsch positiven Screeningergebnissen führen.

Im Bereich der Fettsäurestoffwechselstörungen und Organoazidopathien werden zur Minimierung falsch positiver Befunde bei der Tandemmassenspektrometrie zusätzliche Parameter und Parameterkombinationen erfasst und mitbeurteilt.

Ziel der methodischen Verbesserungen des Neugeborenen Screenings hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität sollte letztlich sein, die beiden Werte so zu verbessern, dass sich ein optimales Kosten-Nutzen-Verhältnis ergibt.

Sowohl für das fluorometrische Testverfahren „Phenylalanin Neonatal“, das für das Screening auf PKU zwischen 1997 und Oktober 2001 angewendet wurde, als auch für die Tandemmassenspektrometrie sind keine falsch negativen Ergebnisse bekannt. Die Sensitivität kann also jeweils mit 1 angegeben werden. Hinsichtlich der Spezifität bestehen beim Screening auf PKU/HPA laut des Chi-Quadrat-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fluorometrie und der Tandemmassenspektrometrie. Die Ursache dafür sind die falsch positiven Befunde, die alleinig durch eine erhöhte Phe/Tyr-Ratio auffällig wurden. Diese Problematik wurde bereits in Kapitel 5.3.1 erörtert. Äußere Einflüsse, die sich auf die Höhe des Phenylalanins im Blut auswirken, werden in Kapitel 3.8 besprochen.

Die Sensitivität der zum Screening auf Galaktosämie eingesetzten Gesamtgalaktosemessung lag mit 0,89 niedriger als die Sensitivität des Screenings auf PKU/HPA. Obwohl die Sensitivität des Screenings mittels Gal-1-PUT-Messung 1 betrug, war der Beobachtungszeitraum zu gering, um die Methode sicher bewerten zu können. Die Spezifitäten der beiden Galaktosämietestmethoden lagen im Beobachtungszeitraum nahe beieinander (Die Spezifität des Screenings auf Gesamtgalaktose betrug 0,999, die des Screenings auf die Gal-1-PUT-Aktivität 0,995). Allerdings deuten die ersten Daten des Thüringer Behandlungszentrums für 2004 darauf hin, dass die Gal-1-PUT-Messung viele heterozygote (oder nicht behandlungsbedürftige) Varianten der Galaktosämie entdeckt (Kapitel 5.3.2). Die Spezifität wäre somit tatsächlich geringer als bei der Gesamtgalaktosemessung. Übereinstimmend mit den seit dem 01.04.2005 geltenden Screeningrichtlinien und den Empfehlungen des bayrischen Modellprojektes kommt man daher auch in Thüringen zu dem Schluss, eine Kombination beider Screeningverfahren einzusetzen. Weitere Einflussfaktoren auf das Galaktosämiescreening sind in Kapitel 3.8 besprochen.

Das Biotinidascreening erreicht im Beobachtungszeitraum eine Sensitivität von 1 und eine Spezifität von 0,998. Damit liegen für dieses Screeningverfahren gute Ergebnisse vor. Das

Biotinidascreening soll daher auch laut den aktuellen Screeningrichtlinien in unveränderter Art und Weise fortgeführt werden.

Betrachtet man die Tandemmassenspektrometrie allgemein, ergibt sich eine Sensitivität von 0,958. Die Ursache hierfür stellt das falsch negative Ergebnis für einen Fall von Propionacidämie dar. Die Spezifität der Methode in den ersten zwei Jahren und zwei Monaten betrug 0,991. Obwohl diese Werte nahezu optimal erscheinen, können aufgrund der Menge an Menschen, die in einem Bevölkerungsscreening erfasst werden, schon geringe Änderungen des Wertes für Spezifität große Änderungen in der Anzahl der falsch positiven Kinder ausdrücken. In Thüringen hätte eine bessere Spezifität der Tandemmassenspektrometrie (0,996 statt 0,991) eine Halbierung der falsch positiven Befunde bedeutet. Anders ausgedrückt, es wäre rund 140 Eltern ein initial falsch positives, besorgniserregendes Testergebnis erspart geblieben. Je größer die Erfahrungen hinsichtlich der Tandemmassenspektrometrie werden, desto mehr werden die in der Literatur beschriebenen Vorteile deutlich.

Nicht zuletzt ist eine exakte Durchführung aller zum Neugeborenencreening gehörenden Schritte notwendig, um optimale Werte für die Sensitivität, die Spezifität und den positiven Vorhersagewert zu erreichen.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Vor Einführung der Tandemmassenspektrometrie lag die Häufigkeit von in Thüringen durch das Neugeborenencreening gefundenen Stoffwechselerkrankungen bei durchschnittlich 1:2.200. Nach Einführung der Tandemmassenspektrometrie stieg die Häufigkeit auf ca. 1:1.100 an und hat sich damit verdoppelt.

Seit Einführung der Tandemmassenspektrometrie in Thüringen konnten erheblich mehr behandlungsbedürftige Erkrankungen frühzeitig erkannt werden, als ohne diese Methode in der entsprechenden Zeit mit konventionellen Methoden gefunden worden wären.

Hinzu kommen neue Erkenntnisse zur Häufigkeit und Ausprägung milder Formen von Stoffwechselstörungen und heterozygoter Patienten.

Analysen anderer Screeninglabors in Deutschland zeigten ein sehr günstiges Kosten- Nutzen-Verhältnis mit einer nur geringen Erhöhung der notwendigen Nachuntersuchungen mit Einführung der Tandemmassenspektrometrie. In Thüringen muss man allerdings rückblickend feststellen, dass es insgesamt zu einem deutlichen Anstieg der notwendigen Zweituntersuchungen nach Einführung der Tandemmassenspektrometrie gekommen ist. Eine Recallrate von über einem Prozent in 2003 allein durch die Tandemmassenspektrometrie ist nicht zufriedenstellend. Ergebnisse aus 2004 belegen allerdings, dass die notwendigen Recalls in Folge positiver TMS-Befunde zurückgehen. Es ist zu vermuten, dass sich dieser Trend mit zunehmenden Erfahrungswerten fortsetzt und letztlich auf einem Wert weit unterhalb der Ein-Prozent-Marke einpegelt.

Auch wenn aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums für das neue Galaktosämie-Screeningverfahren noch keine sicheren Zahlen vorliegen, scheint sich hier ein entgegengesetzter Trend abzuzeichnen. Durch die Empfindlichkeit des neuen Verfahrens finden sich weit mehr milde oder heterozygote Formen der Galaktosämie als durch das Screening auf Gesamthalaktose / Galaktose-1-Phosphat. Dies spricht letztlich für die Kombination beider Verfahren, die bereits im bayrischen Modellprojekt zu sehr guten Ergebnissen führte. Für das Screening auf Biotinidasemangel ergaben sich keine methodischen Veränderungen.

Die Tandemmassenspektrometrie erfasst derzeit bereits ein beachtliches Spektrum an Metaboliten des Stoffwechsels und ist vor allem beim Screening auf Störungen des Aminosäurenstoffwechsels, des Fettsäureabbaus und Erkrankungen des Carnitinstoffwechsels erfolgreich. Dieses spiegelt sich in den aktuellen Neugeborenencreening-Richtlinien wider (Anlage A2).

Bei der Diagnostik angeborener Stoffwechselerkrankungen kann man sich aber nach wie vor nicht ausschließlich auf das Neugeborenencreening verlassen. Ursächlich dafür ist, dass trotz allem nur ein geringer Teil von angeborenen Stoffwechselerkrankungen mittels Neugeborenencreening erfassbar ist und intermittierend verlaufende Erkrankungen im metabolisch kompensierten Stadium ggf. nur in symptomatischen Phasen mit metabolischer Dekompensation detektiert werden. Sollte (auch nach unauffälligen NGS) ein Verdacht auf eine angeborene Stoffwechselerkrankung bestehen, so muss weiterhin ein selektives Screening auf angeborene Stoffwechselerkrankungen durchgeführt werden.

Das selektive Stoffwechselscreening beinhaltet zunächst die Untersuchung von Basisparametern wie Blutbild, Blutzucker, Säuren- Basenstatus und Serumelektrolyten. Basierend auf dieser allgemeinen Diagnostik muss sich eine Untersuchung spezifischer Parameter anschließen. Diese umfasst Leberenzyme (wie ALAT, ASAT, LDH, GLDH), Ammoniak, Lactat (Die Pyruvatbestimmung ist nur bei Lactaterhöhung sinnvoll.), den Lactat-Pyruvat-Quotienten zur Differenzierung zwischen Atmungskettendefekten und Pyruvatdehydrogenasemangel (PDH-Mangel), Aminosäuren im Serum, organische Säuren im Urin sowie auch Acylcarnitine im Trockenblut (mittels Tandemmassenspektrometrie). Einschränkend muss festgestellt werden, dass auch bei Untersuchung dieser eben genannten Parameter nur Erkrankungen des Intermediärstoffwechsels erfasst werden.

Probleme für das Neugeborenencreening ergeben sich besonders dort, wo Frühgeborene oder erkrankte Kinder mit verändertem Metabolitenprofil gescreent werden sollen. An dieser Stelle sind weitere Beobachtungen und Studien notwendig, um die Bewertung der Untersuchungsergebnisse dieser Kinder zu optimieren.

Lysosomale Speicherkrankheiten wie Mucopolysaccharidosen, Oligosaccharidosen, Sphingolipidosen (z.B. Morbus Niemann-Pick, Morbus Gaucher) werden mit den oben genannten Methoden nicht erfasst. Für die Erfassung dieser Erkrankungen können als Screening die Untersuchung von Mucopolysacchariden und Oligosacchariden im Urin, vakuolisierten Lymphozyten im Blutausschrieb und die Suche nach Speicherzellen im Knochenmark dienen. Zur Sicherung der spezifischen Diagnosen sind enzymatische Untersuchungen in Lymphozyten und Fibroblasten notwendig. Auch ist eine postmortem Diagnostik bei ungeklärten kindlichen Todesfällen einschließlich der Durchführung von Stoffwechseluntersuchungen zur humangenetischen Beratung der Familien indiziert.

In einigen Ländern, z.B. Australien, laufen aktuell Pilotprojekte zur Erfassung lysosomaler Speichererkrankungen im Rahmen des Neugeborenencreenings. Diese Pilotprojekte sollen erforschen, inwieweit das Neugeborenencreening geeignet ist, diese Erkrankungen frühzeitig

zu erfassen und dann soweit wie möglich einer adäquaten Therapie zuzuführen (z.B. Stammzelltransplantation, Enzyersatztherapie (ERT)).

In diesem Zusammenhang kann darauf verwiesen werden, dass die Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität-Jena an einer internationalen Studie zur Zulassung der ERT bei MPS1 beteiligt war. Zwischenzeitlich ist die Zulassung der ERT bei MPS 1 erfolgt, nachdem für den Morbus Gaucher bereits seit über zehn Jahren die ERT verfügbar ist. Klinische Studien laufen für weitere Mucopolysaccharidosen (z.B. MPS 2 und MPS 6) und die Glycogenose Typ 2 (Morbus Pompe). Zukünftig ist also mit dem Einsatz der Enzyersatztherapie bei weiteren lysosomalen Erkrankungen zu rechnen, sodass auch in Deutschland über die Einführung des Neugeborenen Screenings auf lysosomale Erkrankungen nachgedacht wird. Mit den zunehmenden Behandlungsmöglichkeiten für lysosomale Erkrankungen wird auch das Screeningkriterium erfüllt, das besagt, dass für die im Neugeborenen Screening erfassten Krankheiten eine wirksame Therapie zur Verfügung stehen muss.

Letztendlich bleibt festzustellen, dass die Zukunft zeigen muss, ob das Screening auf diese und weitere Krankheiten auch die Kriterien des Neugeborenen Screenings erfüllt und in der Folge der nächste große Schritt in der Weiterentwicklung des Neugeborenen Screenings in dieser Richtung ansteht.

Für das **Neugeborenen Screening in der jetzigen Form** kann vorerst eine positive Bilanz gezogen werden. Aufgrund der frühzeitigen Diagnose von Stoffwechselerkrankungen, insbesondere durch die Tandemmassenspektrometrie, sowie mittels der eingesetzten weiteren konventionellen Screeningverfahren konnte Schaden von den betroffenen Kindern und Familien durch Einleitung einer frühzeitigen Behandlung abgewendet werden.

In Hinsicht auf Aufwand-Nutzen bzw. Kosten-Nutzen-Verhältnis ist das Neugeborenen Screening weiterhin erfolgreich und es zeichnet sich ab, dass sich die Ergebnisse in diesem Bereich in Zukunft noch weiter verbessern werden. In jedem Fall erscheint es sinnvoll, die hier durchgeführten Betrachtungen in Zukunft fortzusetzen, um die erhaltenen Ergebnisse zu untermauern oder gegebenenfalls neue Trends zu erkennen. Je größer der Umfang an Personen ist, die in eine Betrachtung eingehen, desto genauer sind die erhaltenen Ergebnisse. Dies gilt natürlich insbesondere bei sehr seltenen Erkrankungen. Dabei ist aber stets auf die Vergleichbarkeit bzw. Strukturgleichheit der untersuchten Populationen zu achten.

Auf diese Weise wird man noch genauere Erkenntnisse über Prävalenz, Inzidenz und Verlauf von Stoffwechselerkrankungen gewinnen und mit großer Wahrscheinlichkeit auf Erkrankungen stoßen, die im hier betrachteten Zeitraum nicht in Erscheinung traten.

Aufgrund der Seltenheit einiger dieser Erkrankungen und der Anzahl der bis Ende 2003 untersuchten Kinder war allerdings auch nicht zu erwarten, positive Fälle aller erfassbaren Erkrankungen zu identifizieren. Einige dieser Erkrankungen konnten in Thüringen kurz nach Abschluss der Datenerfassung im Neugeborenencreening diagnostiziert und in der Folgediagnostik bestätigt werden (persönliche Information durch Ärzte der Stoffwechselsprechstunde). Dazu gehören zwei Fälle mit klassischer Galaktosämie (G/G) und ein Fall von Ahornsirupkrankheit.

Das Neugeborenencreening durch Tandemmassenspektrometrie stellt bezüglich der Früherkennung angeborener Stoffwechselerkrankungen in jedem Fall einen großen Schritt nach vorn dar, da erstmals mit einer Labormethode verschiedene Stoffwechselwege gleichzeitig analysierbar sind. Somit leistet die Tandemmassenspektrometrie einen wesentlichen Beitrag, Stoffwechselstörungen frühzeitig zu erkennen, rechtzeitig zu behandeln und negative Folgen (reversible und irreversible) zu vermeiden.

Im Ergebnis dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Einführung der Tandemmassenspektrometrie in Thüringen, noch bevor die aktuelle Richtlinie zum Neugeborenencreening diese in ihre Empfehlung aufgenommen hat, sich als richtig und notwendig erwiesen hat.

Der Einsatz der Tandemmassenspektrometrie im Neugeborenencreening wird sich in Zukunft weltweit etablieren und der Weiterentwicklung der medizinischen Diagnostik von Stoffwechselstörungen neue Impulse verleihen.

7. Literaturverzeichnis

- Bartlett K., Eaton S.J., Pourfarzam M. 1997. New developments in neonatal screening. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed; 77:F151-F154
- Baumgarten M.R., Almashanu S., Sourmala T., Obie C., Cole Robert N., Packman S., Baumgartner E.R., und Valle D. 2001. The molecular basis of human 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase deficiency. American society of clinical investigations
- Baykal T., Gokcay G.H., Ince Z., Dantas M.F., Fowler B., Baumgartner M.R., Demir F., Can G., Demirkol M. Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: early-onset necrotizing encephalopathy with lethal outcome. J Inherit Metab Dis.; 28(2):229-33.
- Bjugstad K.B., Goodman S.I., Freed C.R. 2000. Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. J Pediatr. Nov;137(5):681-6.
- Boer M.E.J. den, Wanders R.J.A. PhD, Morris A.A.M.MD PhD, Ijlst L., Heymans H.S.A.MD PhD, Wijburg F.A. MD PhD. 2002. Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Clinical Presentation and Follow-up of 50 Patients. Pediatrics Vol.109; 99-104
- Böhles H., Bräutigam C., Hoffmann G.F., Kohlmüller D., Marquardt T., Mayatepek E., Sewell A., Wagner L. 2002. Selective screening for inborn errors of metabolism. APS Edition
- Carpenter K., Wileya V., Simb K. G., Heath D., Wilckena B. 2001. Evaluation of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 275 000 babies. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001;85:F105-F109
- Ceglarek U., Müller P., Stach B., Bührdel P., Thierry J. and Kiess W. 2002. Validation of the Phenylalanine/Tyrosine Ratio Determined by Tandem Mass Spectrometry: Sensitive Newborn Screening for Phenylketonuria, Clin Chem Lab Med 2002; 40(7):693–697 2002 by Walter de Gruyter · Berlin · New York
- Chace D.H., Sherwin J.E., Hillman S.L., Lorey F., Cunningham G.C. 1998. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours Clinical Chemistry, 44,12, 2405-2409

Chace D.H., Sherwin J.E., Hillman S.L., Lorey Fred, Cunningham Georg C. 1998a. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. Clinical Chemistry

Chace D.H., Kalas T.A. and Naylor E.W. 2003. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of dried Blood Specimens from Newborns. Clinical Chemistry, 49:1797-1817

Chace D.H., Pons R., Chiriboga C.A., McMahon D.J., Tein I., Naylor E.W., Vivo D.C.DE. 2003a. Neonatal Blood Carnitine Concentrations: Normative Data by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Pediatric Research

Chuang, D.T., Shih, V.E. 2001. Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria), 1971-2005 In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Volume 2, 8th ed. New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogotá, Caracas, Lisbon, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, New Delhi, San Juan, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, McGraw-Hill

Dezateux C. 2003. Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: evaluating the effects on outcome. European Journal of Pediatrics, Springer Verlag

Dobrowolski S.F., Banas R.A., Suzow J.G., Berkley M. and Naylor E.W. 2003. Analysis of Common Mutations in the Galactose-1-Phosphate Uridyl Transferase Gene. New Assays to Increase the Sensitivity and Specificity of Newborn Screening for Galactosemia. American Society for Investigative Pathology & Association for Molecular Pathology JMD, Vol. 5, No.

Dougherty, F.E., Levy, H.L. 1999. Present newborn screening for phenylketonuria, 144-149 In: Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews Phenylketonuria Wiley & Sons, New York, Vol.5

Ellaway, C.J., Holme, E., Standing, S., Preece, M.A., Green, A., Ploechl, E., Ugarte, M., Trefz, F.K., Leonard, J.V. 2001. Outcome of Tyrosinaemia Type III J. Inherit. Metab. Dis, 24, 824-32

Ensenauer R., Vockley J., Willard J.M., Huey J.C., Sass J.O., Edland S.D., Burton B.K., Berry S.A., Santer R., Grunert S., Koch H.G., Marquardt I., Rinaldo P., Hahn S., Matern D.

2004. A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2004 Dec;75(6):1136-42. Epub 2004 Oct 14

Feinstein J.A., O'Brian K. 2003. Acute metabolic decompensation in an adult patient with isovaleric acidemia. *South Med J.* May 96 (5) : 500-3

Fujimoto A., Okano Y., Miyagi T., Isshiki G., Oura T. 2000. Quantitative Beutler Test for Newborn Mass Screening of Galactosemia Using a Fluorometric Microplate Reader. *Clinical Chemistry* 46: 806-810

Gempel K., Kottlors M., Jaksch M., Gerbitz K.D., Bauer M.F. 1999. Adult carnitine palmitoyltransferase II deficiency: detection of characteristic carnitine esters in serum by tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* Dec;22(8):941-2.

Gempel K., von Praun C., Baumkötter J., Lehnert W., Ensenaer R., Gerbitz K.D., Bauer M.F. 2001. "Adult" form of muscular carnitine palmitoyltransferase II deficiency: manifestation in a 2-year-old child. *Eur J Pediatr.* Sep;160(9):548-5

Gillingham M.B., Connor W.E., Matern D., Rinaldo P., Burlingame T., Meeuws K., Harding C.O. 2003. Optimal dietary therapy of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* Jun;79(2):114-23.

Guilland J.C., Favier A., Potier de Courcy G., Galan P., Hercberg S. 2003.

Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease?. 1. Basic data. *Pathol Biol (Paris).* Mar; 51(2):101-10.

Hall D.M., Michel J.M. 1995. Screening in infancy. *Arch Dis Child* 72: 93-96

Haverkamp F., Fuchs M., Lanzerath D. 2001. In: Zabranskys (Hrsg) Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen. Springer, Wien New York, S.1-4

Heyne K., Shin Y.S., Schwinger E. 1988. Double heterozygosity (transferase-/epimerase-defect) and galactosemia cataract. *Monatsschr Kinderheilkd.* Dec;136(12):828-30.

Hoffmann, G.F., Mayatepek, E. 2001. Stoffwechselerkrankungen, 105-151 In: Speer, C.P., Gahr, M. Pädiatrie; 1.Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Hoffmann G.F., Kries von R., Klose D., Lindner M., Schulze A., Muntau A.C., Röschinger W., Liebl B., Mayatepek E. and Roscher A.A. 2004. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *European Journal of Pediatrics* Feb. (76-80)

Insinga R.P., Laessig R.H., Hoffman G.L. 2002. Newborn screening with tandem mass spectrometry: examining its cost-effectiveness in the Wisconsin Newborn Screening Panel. *J Pediatr.* Oct;141(4):524-31.

Jones P.M., Butt Y. and Bennet M.J. 2003. Accumulation of 3-Hydroxy-Fatty Acids in the Culture Medium of Long-Chain L-3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase (LCHAD) and Mitochondrial Trifunctional Protein-Deficient Skin Fibroblasts: Implications for Medium Chain Triglyceride Dietary Treatment of LCHAD Deficiency. *Pediatric Research* 53:783-787

Koeberl D.D., Millington D.S., Smith W.E. Weavil S.D., Muenzer J., McCandless S.E., Kishnani P.S., McDonald M.T., Chaing S., Boney A., Moore E., Frazier D.M. 2003. Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *J.Inherit.Metab.Dis.* 26 25-35

Koch J.H. 1997. Robert Guthrie The PKU Story, A crusade against mental retardation. Hope Publishing House, Pasadena, California

Lentze M.J., F.J.Schulze, Schaub J., Spranger J. 2003. *Pädiatrie; Grundlagen und Praxis.* Springer, 349-350

Levy, H.L. 1998. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: A New Era *Clin. Chem*, 44, 2401-2402

Liebl B. Kries von R., Nennstiel-Ratzel U., Muntau A.C., Röschinger W., Olgemöller B., Zapf A., Roscher A.A. 2001. Ethisch-rechtliche Aspekte des Neugeborenen Screenings. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 149:1326-1335

Liebl B., Nennstiel-Ratzel U., von Kries R., Roscher A. 2001a. Abschlussbericht zum Modellprojekt zur Neuordnung des Neugeborenen-Screenings in Bayern. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Liebl B, Muntau A.C., Fingerhut R., Knerr I, Röschinger W., Nennstiel-Ratzel U., Olgemöller B., Roscher A.A. 2002. Screening Handbuch, Fachschrift zum Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien, APS

Loeber G., Webster D., Aznararez A. 1999. Quality evaluation of newborn screening programs. Acta Padiatr. Suppl. 432: 3-6

Lucke T., Perez-Cerda C., Baumgartner M., Fowler B., Sander S., Sasse M., Scholl S., Ugarte M., Das A.M. 2004. Propionic acidemia: unusual course with late onset and fatal outcome. Metabolism. Jun;53(6):809-10.

Meissner T., Leichsenring M., Mayatepek E. 2004. Odd-numbered long-chain fatty acids in erythrocyte phospholipids as long-term follow-up parameter in propionic acidemia. Clin Chem Lab Med.; 42(9):1005-8.

Mitchell G.A., Grompe M., Lambert M., Tanguay R.M. 2001. Hypertyrosinemia, 1777 In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D.: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease; Volume 2, 8th ed. New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogotá, Caracas, Lisbon, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, New Delhi, San Juan, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, McGraw-Hill

Morgenthaler J. 2004. Bestimmung von Referenzwerten für krankheitsrelevante Aminosäurenkonzentrationen im Trockenblut mittels Tandem-Massenspektrometrie in einem Normalkollektiv gesunder Neugeborener. Dissertation Reutlingen

Mudd S.H., Levy H.L., Tangerman A., Boujet C., Buist N., Davidson-Mundt A., Hudgins L., Oyanagi K., Nagao M., Wilson W.G. 1995. Isolated persistent hypermethioninemia. Am J Hum Genet. Oct;57(4):882-92.

Müller-Sinik K., Haverkamp F. Psychosoziale Auswirkungen 2001. In: In: Zabranskys (Hrsg) Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen. Springer, Wien New York, S.1-4

Naughten E.R., Yap S., Mayne P.D. 1998. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. Eur J Pediatr. Apr;157 Suppl 2:S84-7

Naylor Edwin W., PhD; Chace Donald H., PhD 1999. Automated Tandem Mass Spectrometry for Mass Newborn Screening for Disorders in Fatty Acid, Organic Acid, and Amino Acid Metabolism. *Journal of Child Neurology*, Volume 14, Supplement1, November

Neumann-Laniec M., Wierzba J., Irga N., Zaborowska S.M., Balcerska A. 2002. LCHAD (long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) deficiency as a cause of sudden death of a three months old infant. *Med Wieku Rozwoj.* Jul-Sep;6(3):221-6

Olsen R.K., Andresen B.S., Christensen E., Bross P., Skovby F., Gregersen N. 2003. Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum Mutat.* Jul;22(1):12-23.

Pandor A., Eastham J., Beverley C., Chilcott J., Paisley S. 2004. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technology Assessment*; Vol.8: No. 12

Parnetti L, Caso V, Santucci A, Corea F, Lanari A, Floridi A, Conte C, Bottiglieri T. 2004. Mild hyperhomocysteinemia is a risk-factor in all etiological subtypes of stroke. *Neurol Sci.* Apr;25(1):13-7

Podskarbi T. und Bieger W.P. (Medizinisch Immunologische Laboratorien Münschen) 1995. Neonatal Screening and differential diagnosis of galactosamia. *Clin. Lab.*; 41: 843-847

Pollitt R.J., Green A., McCabe C.J., Booth A., Cooper N.J., Leonard J.V., Nicholl J., Nicholson P., Tunaley J.R., Virdi N.K. 1997. Newborn Screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome *Health Technology Assessment*, Vol. 1: No.7

Pollitt R.J., Leonard J.V. 1998. Prospective surveillance study of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the UK. *Arch Dis Child*; 79:116-119 (August)

Roscher A.A., Fingerhut R., Liebl B., Olgemöller B. 2001. Erweiterung des Neugeborenen-Screenings durch Tandemmassenspektrometrie. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 149:1297-1303

Russo P.A., Mitchell G.A., Tanguay R.M. 2001. Tyrosinemia: a review. *Pediatr Dev Pathol.* May-Jun;4(3):212-21

Rutledge S.L., Berry G.T., Stanley C.A., van Hove J.L., Millington D. 1995. Glycine und L-carnitine therapy in 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase deficiency, J Inherit. Metab. Dis.; 18(3):299-305

Sainani G.S., Sainani R. 2002. Homocysteine and its role in the pathogenesis of atherosclerotic vascular disease. J Assoc Physicians India. May;50 Suppl:5-8.

Sander J., Janzen N., Sander S., Steuerwald U., Das A.M., Scholl S., Trefz F.K., Koch H.G., Häberle J., Korall H., Marquardt I., Korenke C. 2003. Neonatal Screening for citrullinaemia. Eur. J. Pediatr. 162; 417-420

Sass JO, Hofmann M, Skladal D, Mayatepek E, Schwahn B, Sperl W. 2004. Propionic acidemia revisited: a workshop report. Clin Pediatr (Phila). Nov-Dec;43(9):837-43.

Schoen E.J.MD; Baker J.C. MD; Colby C.J. PhD; To T.T.BS 2002. Cost-Benefit-Analysis of Universal Tandem Mass Spectrometry for Newborn Screening. Pediatrics Vol.110 4 October pp 781-786

Schulze A., Kohlmüller D., Mayatepek E. 1999. Sensitivity of electrospray-tandem mass spectrometry using the phenylalanine/tyrosine-ratio for differential diagnosis of hyperphenylalaninemia in neonates. Clinica Chimica Acta 283 15-20

Schulze Andreas, MD; Lindner Martin, MD; Kohlmüller Dirk, PhD; Olgemöller Katharina; Mayatepek Ertan MD; Hoffmann G.F., MD 2003. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: results, Outcome and Implications. PEDIATRICS Vol.111 No.6 June

Seidel J., Kauf E., Deufel T. und Bergmann R. 2002. Erweitertes Neugeborenen Screening in Thüringen. Ärzteblatt Thüringen 13 9

Seidel J., Streck S., Bellstedt K., Vianey-Saban C., Pedersen C.B., Vockley J., Korall H., Roskos M., Deufel T., Trefz K.F., Sewell A.C., Kauf E., Zintl F., Lehnert W., Gregersen N. 2003. Recurrent vomiting and ethylmalonic aciduria associated with rare mutations of the short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. Inherit Metab Dis.;26(1):37-42

Sim K.G., Wiley V., Carpenter K., Wilcken B. 2001. Carnitine palmitoyltransferase I deficiency in neonate identified by dried blood spot free carnitine and acylcarnitine profile. J Inherit Metab Dis. Feb;24(1):51-9.

- Smith W.E., Millington D.S., Koeberl D.D., Lesser P.S. 2001. Glutaric acidemia, type I, missed by newborn screening in an infant with dystonia following promethazine administration. *Pediatrics*. 2001 May;107(5):1184-7.
- Stach B. Bührdel P. Müller P. 2002. Anwendung der Tandem-Massenspektrometrie für die Früherkennung angeborenen Stoffwechselerkrankungen in Thüringen. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 5/02
- Stauber M., Weyerstahl T. 2001. Regelwidrige Schwangerschaftsdauer In: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Thieme S. 639-643
- Tanaka K., Gregersen N., Ribes A., Kim J., Kolvraa S., Winter V., Eiberg H., Martinez G., Deufel T., Leifert B., Santer R., Francois B., Pronicka E., Laszlo A., Kmoch S., Kremensky I., Kalaydjicva L., Ozalp I., Ito M. 1997. A survey of the newborn populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for the G985 variant allele with haplotype analysis at the medium chain Acyl-CoA dehydrogenase gene locus: clinical and evolutionary consideration. *Pediatr Res*. Feb;41(2):201-9.
- Tokatli A., Coskun T., Ozalp I. 1998. Isovaleric acidemia. Clinical presentation of 6 cases. *Turk J Pediatr*. Jan-Mar;40(1):111-9.
- Venditti L.N., Venditti C.P., Berry G.T., Kaplan P.B., Kaye E.M., Glick H., Stanley C.A. 2003. Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cost-effectiveness analysis. *Pediatrics*. Nov;112(5):1005-15
- Verhees H.G. 1999. Finanzierung des Neugeborenen-Screenings in Sachsen. In: *Zabranskys (Hrsg) Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen*. Springer, Wien New York, S.1-4
- Visser G., Sourmala T., Peter G., Smit A., Reijngoud D., Bink-Boelkens M.Th.E., Niezen-Koning Klary E., Baumgartner E.R. 2000. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father. *Eur J Pediatr* 159; 901-904
- Voll R., Hoffmann G.F., Lipinski C.G., Trefz F.K., Weisser J. 1993. Glutaric acidemia/glutaric aciduria I as differential chorea minor diagnosis. *Klin Padiatr*. Mar-Apr;205(2):124-6.

- Walter J. 2001. Maple Syrup Urine Disease: An Overview (branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase deficiency; Willink Biochemical Genetics Unit, Manchester Children's Hospital, BIMDG Bulletin Spring
- Wei C.C., Lin W.D., Tsai F.J., Wu J.Y., Peng C.T., Tsai C.H. 2004. Isovaleric acidemia diagnosed promptly by tandem mass spectrometry: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan*. Jul-Aug;45(4):236-8.
- Wilcken B., M.B., B.Ch., Wiley V., Ph.D., Hammond J., Ph.D., and Carpenter K., Ph.D. 2003. Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry. *The New England Journal of Medicine*
- Wilson J.M.G., Junger G. 1968. Principles of screening for disease. Geneva: World Health Organization; 26-39
- Wood J.C., MD, PhD, Magera M. J., MA, Rinaldo P., Reed Seashore M., Strauss A.W. und Friedman A. 2001. Diagnosis of Very Long Chain Acyl-Dehydrogenase Deficiency From an Infant's Newborn Screening Card. *PEDIATRICS* Vol. 108 No. 1 July, p. e19
- Yap S., Naughten E. 1998. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis*. Oct;21(7):738-47.
- Yoshino, M., Koga, Y., Yamashita, F. 1986. A decrease in glycine cleavage activity in the liver of a patient with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis*, 9, 399-400
- Zabransky S., Prof. Dr. in Zusammenarbeit mit den deutschen Screeningzentren, Datenerhebung 2003 der Deutschen Gesellschaft für das Neugeborenen-Screening auf endokrine und metabolische Störungen (DGNS), Homepage 2004
- Zabransky S. 2001. Jahresstatistik 1999 der deutschen Screening-Zentren. In: Siegfried Zabransky (Hrsg.) Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen. Springer WienNewYork S. 49-60
- Zabransky S. 2001. Biotinidasemangel. In: Siegfried Zabransky (Hrsg.) Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen. Springer WienNewYork S. 250-254

Zschocke J., Hoffmann G.F. 1999. Vademecum Metabolicum (Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselkrankheiten). Milupa / Schattauer 2. Auflage

Zschocke J., Schulze A., Lindner M., Fiesel S., Olgemöller K., Hoffmann G.F., Penzien J., Ruiter J.P.N., Wanders R.J.A., Mayatepek E. 2001. Molecular and functional characterisation of mild MCAD deficiency. Human Genetics, Springer Verlag

Zytkowicz T.H., Fitzgerald E.F., Marsden D., Larson C.A., Shih V.E., Johnson D.M., Strauss A.W., Comeau A.M., Eaton R.B., and Grady G.F. 2001. Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots. Clinical Chemistry; 47:1945-1955

8. Anhang

A1: Erkrankungen, die mittels Tandem-Massenspektrometrie im *Erweiterten Neugeborenen Screening* erfasst werden können

Aminosäurenstoffwechselstörungen

Nonketotic Hyperglycinämie

Cystathione β -Synthetase Mangel (Homocystinurie)

Ahornsirupkrankheit

Tyrosinämie

 Type I

 Type II

PKU/Hyperphenylalaninämie(HPA)

Fettsäurestoffwechselstörungen

Short-Chain Acyl- CoA Dehydrogenase Mangel

Medium-Chain-Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel

Very-long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Mangel

Multipler Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel

Carnitin-Transporter-Defect

Carnitin-Palmitoyl- Transferase Mangel

 Typ I

 Typ II

Carnitin-Acylcarnitine-Translocase-Mangel

Organoazidopathien

Propionyl –CoA Carboxylase Mangel

Methylmalonyl-CoA-Mutase-Mangel plus Cobalamin A and B Mangel

Cobalamin C-Mangel

Isovalericacidurie

Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel

Holocarboxylase-Synthase-Mangel

Biotinidasemangel

Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase-Mangel

Methylglutaconicacidurie

3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel

3-Ketothiolase-Mangel(6)

Harnstoffzyklusdefekte

Carbamyl Phosphate Synthetase Mangel

Ornithine Transcarbamylase Mangel

Argininosuccinat Synthase Mangel

Argininosuccinat Lyase Mangel

Arginase Mangel

Citrullinämie, typeII (citrin deficiency)

Tabelle übersetzt und modifiziert nach Schulze et al. (2003), Übersicht über potentiell durch die Tandemmassenspektrometrie erfassbare Erkrankungen.

A2: Auszug aus den aktuellen Screeningrichtlinien, mit direktem Zusammenhang zur vorliegenden Arbeit

Bekanntmachungen: Beschluss über eine Änderung der Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres (Kinder-Richtlinien) zur Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screenings vom 21. Dezember 2004

Deutsches Ärzteblatt 102, Ausgabe 16 vom 22.04.2005, Seite A-1158 / B-970 / C-914
BEKANNTGABEN DER HERAUSGEBER: Kassenärztliche Bundesvereinigung

Der Gemeinsame Bundesausschuss hat in seiner Sitzung vom 21. Dezember 2004 den folgenden Beschluss gefasst:

I. Die Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres (Kinder-Richtlinien) in der Fassung vom 26. April 1976 (Beilage Nr. 28 zum BAnz vom 11. November 1976), zuletzt geändert am 10. Dezember 1999 (BAnz 2000 S. 4603), werden wie folgt geändert:

1. In Abschnitt A „Allgemeines“ wird in Nr. 3 am Ende des letzten Satzes der Satz eingefügt: „Neugeborene haben zusätzlich Anspruch auf ein erweitertes Neugeborenen-Screening nach Maßgabe der Anlage 2 der Richtlinien.“

2. In Abschnitt B „Untersuchungen“ wird vor Nr. 1 Absatz 1 Satz 1 nach den Worten „gegebenen Hinweisen“ die Worte „und das erweiterte Neugeborenen-Screening nach Anlage 2“ angefügt.

4. Die Anlagen 2 bis 4 der Richtlinien werden wie folgt gefasst:

Anlage 2: Erweitertes Neugeborenen-Screening

Allgemeine Bestimmungen

§ 1

Allgemeines

(1) Das nach diesen Richtlinien durchzuführende erweiterte Neugeborenen-Screening dient der Früherkennung von angeborenen Stoffwechseldefekten und endokrinen Störungen bei Neugeborenen, die die körperliche und geistige Entwicklung der Kinder in nicht geringfügigem Maße gefährden. Durch das Screening soll eine unverzügliche Therapieeinleitung im Krankheitsfall ermöglicht werden.

(2) Das Screening umfasst ausschließlich die in § 5 als Zielkrankheiten aufgeführten Stoffwechseldefekte und endokrinen Störungen.

§ 3

Anspruchsberechtigung

Neugeborene haben Anspruch auf Teilnahme am erweiterten Neugeborenen-Screening entsprechend dieser Richtlinie.

§ 4

Aufklärung und Einwilligung

Die Eltern (Personensorgeberechtigten) des Neugeborenen sind nach der Geburt, aber vor der Durchführung des Screenings eingehend und mit Unterstützung eines Informationsblattes entsprechend Anlage 3 zu Sinn, Zweck und Ziel des Screenings aufzuklären. Ihre Einwilligung oder Ablehnung ist mit der Unterschrift zumindest eines Elternteiles (Personensorgeberechtigten) zu dokumentieren.

§ 5

Zielkrankheiten und deren Untersuchung

(1) Im erweiterten Neugeborenen-Screening wird ausschließlich auf die nachfolgenden Zielkrankheiten gescreent:

1. Hypothyreose
2. Adrenogenitales Syndrom (AGS)
3. Biotinidasemangel
4. Galaktosämie

5. Phenylketonurie (PKU) und Hyperphenylalaninämie (HPA)
 6. Ahornsirupkrankheit (MSUD)
 7. Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MCAD)
 8. Long-Chain-3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (LCHAD)
 9. Very-Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (VLCAD)
 10. Carnitinzyklusdefekte
 - a) Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I-Mangel (CPT-I)
 - b) Carnitin-Palmitoyl-Transferase-II-Mangel (CPT-II)
 - c) Carnitin-Acylcarnitin-Translocase-Mangel
 11. Glutaracidurie Typ I (GA I)
 12. Isovalerialacidämie (IVA).
- (2) Das Screening auf die Zielkrankheiten Nummern 1–4 erfolgt mit konventionellen Laboruntersuchungsverfahren (Nr. 1 und Nr. 2 mittels immunometrischer Tests [Radioimmunoassays/Fluoroimmunoassays], Nr. 3 mittels eines photometrischen Tests, Nr. 4 mittels eines photometrischen und fluorometrischen Tests). Das Screening auf die Zielkrankheiten Nummern 5–12 wird mittels der Tandemmassenspektrometrie durchgeführt.
- (3) Die Untersuchung weiterer, nicht in Absatz 1 genannter Krankheiten ist nicht Teil des Screenings. Daten zu solchen Krankheiten sind, soweit technisch ihre Erhebung nicht unterdrückt werden kann, unverzüglich zu vernichten. Deren Nutzung, Speicherung oder Weitergabe ist nicht zulässig. Die im Rahmen des Screenings erhobenen Daten dürfen ausschließlich zu dem Zweck verwendet werden, die vorgenannten Zielkrankheiten zu erkennen und zu behandeln.

II.

Verfahren

§ 6

Grundsätze des Screening-Verfahrens

- (1) Der Erfolg des Screenings ist insbesondere abhängig von der Zuverlässigkeit der Befundergebnisse und der Schnelligkeit, mit der in Verdachtsfällen die Abklärungsdiagnostik durchgeführt und die therapeutischen Maßnahmen eingeleitet werden.
- (2) Zur zuverlässigen Diagnose ist bei einem ersten auffälligen Befund sofort eine zweite Laboruntersuchung durchzuführen. Das Verfahren und die Verantwortlichkeiten sind dabei die gleichen wie bei der Erstbefundung. Ergibt auch die zweite Untersuchung einen auffälligen Befund, ist eine dem Befund angemessene unverzügliche Abklärung und ggf. Therapieeinleitung zu veranlassen.
- (3) Zwischen der Abnahme der Probe und der Übermittlung eines auffälligen Befundes an den Einsender sollen nicht mehr als 72 Stunden liegen.

§ 8

Zeitpunkt der Probenentnahmen

- (1) Der optimale Entnahmezeitpunkt ist die 48. bis 72. Lebensstunde. Die Blutprobe soll nicht vor der 36. und nicht nach der 72. Lebensstunde entnommen werden. In diesem Zeitfenster versäumte Probenentnahmen müssen unverzüglich nachgeholt werden.
- (2) Bei Entlassung vor der 36. Lebensstunde oder Verlegung soll eine erste Probe entnommen werden. Ein früherer Untersuchungszeitpunkt als die 36. Lebensstunde erhöht das Risiko von falschnegativen und falschpositiven Befunden. Bei Entlassung vor der 36. Lebensstunde müssen die Eltern (Personensorgeberechtigten) daher über die Notwendigkeit einer termingerechten zweiten Laboruntersuchung informiert werden.
- (3) Die erste Probenentnahme soll vor einer Transfusion, Kortikosteroid- oder Dopamintherapie durchgeführt werden.
- (4) Bei sehr unreifen Neugeborenen (Geburt vor der 32. Schwangerschaftswoche) muss außer dem Erstscreening nach Absatz 1 ein abschließendes Zweitscreening in einem korrigierten Alter von 32 Schwangerschaftswochen erfolgen.

§ 9

Probenentnahme und Probenbearbeitung

- (1) Der verantwortliche Einsender (§ 7) muss natives Venen- oder Fersenblut

entnehmen, auf speziell dafür vorgesehenes Filterpapier (Filterpapierkarte) auftropfen und bei Raumtemperatur trocknen. Die Berechtigung zur Blutentnahme richtet sich nach dem Berufsrecht des jeweiligen Leistungserbringers.

(2) Die Probenentnahme, die Angaben zum Neugeborenen und das Datum der Versendung der Blutprobe sind auf der Filterpapierkarte gemäß Anlage 4 und in geeigneter Weise auch im Kinderuntersuchungsheft zu dokumentieren, um die Überprüfung der erfolgten Blutentnahme im Rahmen der U2 zu ermöglichen.

(3) Der verantwortliche Einsender hat durch Festlegung geeigneter Maßnahmen die eindeutige Probenzuordnung zum Neugeborenen sicherzustellen.

(4) Die Filterpapierkarte ist an einen zur Durchführung der notwendigen Laborleistungen nach § 11 berechtigten Arzt zu senden.

(5) Das Entnahmedatum soll zugleich Probenversanddatum sein.

(6) Die Ablehnung des Screenings oder der Tod des Neugeborenen vor einer möglichen ersten Blutentnahme nach § 8 sind auf leeren Filterpapierkarten zu dokumentieren und an das Screeninglabor zu senden.

III.

Genehmigung und Qualitätssicherung für Laborleistungen

§ 13

Anforderungen an die Labore

(1) Zur Optimierung der internen Qualitätssicherung und der Logistik des Screenings sowie der Wirtschaftlichkeit ist eine Mindestzahl von 50 000 untersuchter Erstscreeningproben innerhalb eines Jahres und in einem Labor Voraussetzung für die Teilnahme am Screening. Die zuständige Kassenärztliche Vereinigung kann die Frist für die Erfüllung der Mindestzahlen in der Anfangsphase einmal um höchstens ein Jahr verlängern.

(2) Das Labor muss für die durchzuführenden Untersuchungen mit den entsprechenden technischen Einrichtungen ausgestattet sein und über qualifiziertes Personal verfügen. Diese organisatorisch-apparativen Voraussetzungen gelten mit einer Akkreditierung für medizinische Laborleistungen durch die Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie (DACH) oder einem von der zuständigen Kassenärztlichen Vereinigung als gleichwertig anerkannten Akkreditierungsverfahren als belegt.

(3) Die Genehmigung ist unter der Auflage zu erteilen, dass das Labor, in dem die Laborleistungen erbracht werden sollen, die folgenden Leistungen erbringt:

- Versendung der Filterpapierkarten an die Leistungserbringer, für die das Labor Laborleistungen nach dieser Richtlinie erbringt, und
- Erstellung und vierteljährliche Aktualisierung eines Verzeichnisses der nächsterreichbaren Zentren mit pädiatrischen Stoffwechselspezialisten oder Endokrinologen mit 24-stündiger Erreichbarkeit zur Information nach § 10 Abs. 1.

II. Der Beschluss tritt am 1. April 2005 in Kraft.

Siegburg, den 21. Dezember 2004

Gemeinsamer Bundesausschuss

Der Vorsitzende: Dr. jur. R. Hess

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren..... | 14 |
| Abbildung 2: Phenylalanin und Tyrosinabbau..... | 17 |
| Abbildung 3: Abbau von Fettsäuren | 19 |
| Abbildung 4: Prinzip der Tandemmassenspektrometrie | 32 |
| Abbildung 5: Beispiel für ein Massenspektrum..... | 33 |
| Abbildung 6: Verhältnis von Geburten zu Screenings..... | 42 |
| Abbildung 7: Anzahl auffälliger Ersts Screenings nach Erkrankung bzw. Art des Tests..... | 44 |
| Abbildung 8: Anzahl der Recalls in den entsprechenden Jahren | 45 |
| Abbildung 9: Verhältnis positiver Recalls zu bestätigten Diagnosen | 45 |
| Abbildung 10: Gruppenvergleich PKU, HPA und falsch Positive | 49 |
| Abbildung 11: Höhe des Phe/Tyr-Quotienten bei PKU, HPA und falsch Positiven | 50 |
| Abbildung 12: Korrelation zwischen Gesamtgalaktose und der Gal-1-PUT-Aktivität | 53 |
| Abbildung 13: Verteilung positiver Ersts Screeningbefunde und positiver Recalls 2002 | 59 |
| Abbildung 14: Verteilung positiver Ersts Screeningbefunde und positiver Recalls 2003 | 60 |
| Abbildung 15: Octanoyl-Carnitin (C8) bei MCAD-Mangel-Patienten und falsch Positiven .. | 65 |
| Abbildung 16: Auffällige unterteilt nach Gestationsalter (N = 225) | 67 |
| Abbildung 17: Gestationsalter bei Tyrosinerhöhung (N = 23) | 68 |
| Abbildung 18: Gestationsalter für Citrullinerhöhung (N = 42)..... | 69 |
| Abbildung 19: Gestationsalter bei Argininerhöhung (N = 17) | 69 |
| Abbildung 20: Höhe der auffälligen Tyrosin-Werte in Abhängigkeit vom Alter bei der Geburt | 70 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Für das Neugeborenencreening empfohlene Zielkrankheiten | 13 |
| Tabelle 2: Bezugsdaten der Jahre 1997-2003 | 41 |
| Tabelle 3: Auffällige und bestätigte Screeningfälle von 1997-2001..... | 43 |
| Tabelle 4: Bezugsdaten der konventionellen Screeningverfahren | 46 |
| Tabelle 5: Vergleich der Labormethoden zum PKU-Screening | 47 |
| Tabelle 6: Vergleich der Screeningparameter Phenylalanin und Phe/Tyr-Ratio | 48 |
| Tabelle 7: Genotypen der gefundenen Galaktosämien..... | 52 |
| Tabelle 8: Häufigkeit des Biotinidasemangels..... | 54 |
| Tabelle 9: Verteilung der auffälligen Befunde in den Jahren 2002 und 2003 | 57 |
| Tabelle 10: Kontrollbedürftige und falsch positive Befunde 2002 und 2003 | 62 |
| Tabelle 11: Positive Resultate der Tandemmassenspektrometrie (TMS); | 63 |
| Tabelle 12: Screeningwerte für Kinder mit nachgewiesenem MCAD-Mangel | 65 |
| Tabelle 13: Zusammenhang zwischen auffälligem Screeningparameter und Gestationsalter . | 71 |

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Simone Gehlert
Geburtsdatum: 11.08.1980
Geburtsort: Schmölln
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig
Eltern: Siegfried Gehlert, Elektromeister
Gudrun Gehlert, Dipl.-Ing. Papierverarbeitung und Verpackungstechnik

Ausbildung:

09/1987 bis 07/1991 Grundschole am Eichberg in Schmölln
09/1991 bis 07/1999 Staatliches Gymnasium Schmölln
07/1999 Abitur
10/1999 bis 09/2001 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/2001 Ärztliche Vorprüfung
10/2001 bis 2006 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/2002 Erstes Staatsexamen an der FSU Jena
08/2004 Zweites Staatsexamen an der FSU Jena
seit 04/2005 Praktisches Jahr an der FSU Jena

Praktika

03/2002 Famulatur Praxis für Innere Medizin von Dr. Andreas Jacobi, Schmölln
03/2003 Kardiologische Station der Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Jena
09/2003 Klinik Sonnenhof, Notfallstation, Bern, Schweiz
03/2004 Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena
04/2005 Praktisches Jahr 1.Tertial: Klinik für Unfall- und Wiederherstellungs-
chirurgie des Universitätsklinikums Jena, Direktor Dr. med. habil.
Hofmann
08/2005 Praktisches Jahr 2.Tertial: Klinik für Innere Medizin II des Sophien- und
Hufelandklinikums Weimar, Direktor PD Dr. med. habil. Secknus

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. Jörg Seidel*, Dr. Vollandt (Statistik), Dr. Bergmann (TLLV Erfurt)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 29.10.2005

Simone Gehlert

* ehemals tätig an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der FSU Jena, jetzt tätig an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des SRH-Klinikums-Gera

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich es nicht versäumen, mich bei den Menschen zu bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. habil. E.Kauf für die Bereitstellung dieses interessanten Dissertationsthemas.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. med. habil. J.Seidel, dessen Geduld ich stets bewundert habe und ohne dessen Ideen und Unterstützung es nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit fertigzustellen.

Herrn Dr. Bergmann und Frau Hossbach vom TLLV in Erfurt sowie Schwester Christine aus der Abteilung „Klinische Genetik“ der Universitätsklinik Jena danke ich für die unersetzliche Hilfe bei der Recherche für diese Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.